

Mechanismen der posttraumatischen Immundepression

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Claudia Sievers

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen:

Prof. Dr. Hans-Dieter Volk

PD Dr. Corinna Hermann

Prof. Dr. Alf Hamann

Tag der mündlichen Prüfung: 28 Juli 2010

Mechanismen der posttraumatischen Immundepression

- Rolle der Hämoxygenase-1 in der Monozytendeaktivierung -

Inhaltsverzeichnis

Mechanismen der posttraumatischen Immundepression.....	1
Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung.....	12
1.1 Klinische Bedeutung der Immundepression	12
1.2 Das Prinzip des Immunsystems	14
1.2.1 Funktion von Monozyten.....	17
1.2.2 Aktivierung von Lymphozyten durch Antigenpräsentation.....	18
1.3 Fehlregulation des Immunsystems - die Immundepression	19
1.3.1 Immunmodulatorische Mediatoren der Immundepression.....	22
1.4 Die Hämoxygenase	24
1.4.1 Die immunmodulatorischen Eigenschaften von Hämoxygenase-1	25
1.4.2 Die Induktion von Hämoxygenase-1	26
1.5 CD163 - der Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor.....	27
1.6 Die Regulation der MHC-II Expression.....	28
1.6.1 MHC-II Genregulation durch Histonacetylierung	30
1.6.2 MHC-II Genregulation durch PKA-Aktivierung.....	32
1.6.3 MHC-II Genregulation durch MAPK.....	33
1.7 Synthese und Beladung von MHC-II Molekülen	34
2. Fragestellung und Ziel der Arbeit	35
3. Material und Methoden	36
3.1 Materialien	36
3.1.1 Zellkultur und Stimulation	36
3.1.1.1 Medien, Lösungen und Reagenzien	36
3.1.1.2 Stimulantien und Inhibitoren	36
3.1.2 Zellseparation	37
3.1.2.1 MACS	37
3.1.2.2 Rosette Sep.....	37
3.1.3 Durchflusszytometrie	38
3.1.3.1 Puffer	38
3.1.3.2 Antikörper	38
3.1.4 Transfektion (Gene knock down).....	39
3.1.4.1 siRNA.....	39

3.1.4.2	Kit.....	39
3.2	Western Blot	39
3.2.1	Puffer	39
3.2.2	Antikörper	40
3.2.3	Entwicklung.....	41
3.3	RNA Analyse	41
3.3.1	RNA-Präparation	41
3.3.2	cDNA-Präparation.....	41
3.3.3	Konventionelle PCR.....	41
3.3.4	RT-PCR	42
3.4	Verwendete Geräte.....	43
3.5	Verbrauchsmaterialien.....	44
3.6	Die verwendeten Porphyrine	44
3.7	Die verwendeten Stimulantien	44
3.8	Die verwendeten Inhibitoren	46
3.9	Methoden.....	48
3.9.1	Zellpräparation.....	48
3.9.1.1	Gewinnung von humane Primärzellen.....	48
3.9.1.2	Dichtegradientenzentrifugation zur Aufreinigung der Zellen	49
3.9.2	Zellseparation	49
3.9.2.1	Positivseparation von Monozyten, B-Zellen und T-Zellen mittels MACS (Magnetic Bead Associated Cell Sorter).....	50
3.9.2.2	Negativseparation von Monozyten mittels RosetteSep Monocyte Enrichment Cocktail.....	50
3.9.3	Zellzählung	51
3.9.4	Zellkultur und Stimulationen	51
3.9.5	Durchflusszytometrie	53
3.9.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	53
3.9.5.2	Identifikation der Zellpopulationen und Überprüfung der Reinheit nach Zellseparation	55
3.9.6	Analyse der HLA-DR Expression.....	57
3.9.6.1	FACS-Färbung der HLA-DR Oberflächenexpression von Monozyten.....	58
3.9.6.2	FACS-Färbung der intrazellulären HLA-DR-Expression von Monozyten	58
3.9.7	Färbung der intrazellulären STAT-1-Phosphorylierung	59
3.9.8	Färbung der intrazellulären STAT-3-Phosphorylierung	59

3.9.9	Gene knock down mittels small interference RNA.....	60
3.9.9.1	Transfektion der siRNA mittels Elektroporation	61
3.9.10	Proteinanalyse mittels Western Blot.....	61
3.9.10.1	Probenvorbereitung	62
3.9.10.2	Gelelektrophorese mittels SDS-Polyacrylamidgel	62
3.9.10.3	Semi-Dry-Blotting.....	63
3.9.10.4	Ponceau-Färbung	64
3.9.10.5	Immunfärbung und Visualisierung der Proteinbanden.....	64
3.9.10.6	Visualisierung mittels ECL (Enhanced ChemiLuminescence).....	64
3.9.10.7	Visualisierung mittels ODYSSE Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences)	65
3.9.11	Genexpressionsanalyse	66
3.9.11.1	RNA-Präparation	66
3.9.11.2	cDNA-Synthese	66
3.9.11.3	Konventionelle PCR.....	67
3.9.11.4	Real time PCR nach der TaqMan-Methode.....	68
3.9.12	Zytokinmessung mittels Immulite.....	69
3.9.13	Statistik	70
4.	Ergebnisse.....	71
4.1	HO-1-Expression in humanen Monozyten	71
4.2	Effekte von HO-1-Induktoren auf den Phänotyp von humanen Monozyten	73
4.2.1	Beeinflussung der monozytären HLA-DR-Expression	73
4.2.2	Einfluss von CoPP auf die MHC-II-Expression von B-Zellen und die MHC-I-Expression von Monozyten	75
4.2.3	Genexpression der MHC-II-regulierenden costimulatorischen Moleküle nach CoPP-induzierter HO-1 Hochregulation.....	76
4.2.4	Beeinflussung der konstitutiven CIITA-Expression.....	78
4.2.5	Einfluss einer CoPP-Behandlung auf die IFN- γ -induzierte MHC-II-Expression.....	78
4.3	Nachweis der HO-1-Spezifität	81
4.3.1	HO-1-Proteinexpression im Vergleich nach CoPP- und Hämin-Behandlung	81
4.3.2	Kinetik der HO-1-Expression in Monozyten nach CoPP- und Hämin-Behandlung.....	82
4.3.3	Einfluss von Hämin auf die monozytäre HLA-DR-Expression	84
4.3.4	Hemmung der HO-1-Expression mittels siRNA.....	85
4.4	Rolle des Hämoglobin-Scavenger Rezeptors in der Porphyrin-vermittelten Hemmung der HLA-DR-Expression.....	87

4.4.1	Einfluss einer HbHg-Behandlung auf die konstitutive HLA-DR-Expression in Monozyten	87
4.4.2	Einfluss von IL-10 auf die Porphyrin-Effekte.....	89
4.4.3	Beeinflussung der Porphyrin-Effekte durch Blockieren von CD163 (Hämoglobin- Scavenger-Rezeptor).....	90
4.5	Welche intrazellulären Signalwege werden durch Protoporphyrine beeinflusst ?	92
4.5.1	Einfluss von CoPP auf die IFN- γ -induzierte STAT-1-Phosphorylierung	92
4.5.2	Einfluss von CoPP auf die STAT-3-Phosphorylierung in humanen Monozyten	93
4.5.3	Beeinflussung der CoPP-Effekte durch Hemmung der Histondeacetylierung	96
4.5.4	Beeinflussung der Porphyrin-Effekte durch Hemmung von Protein Kinase A	97
4.5.5	Beeinflussung der konstitutiven HLA-DR-Expression durch MAPK	98
5.	Diskussion	100
5.1	Die Rolle der HO-1 bei den Protoporphyrin-vermittelten Effekten auf den Phänotypen von Monozyten	100
5.2	Die Rolle von CD163 bei den Protoporphyrin-vermittelten Effekten auf den Phänotypen von Monozyten	103
5.3	Mechanismen der Porphyrin-vermittelten Hemmung der monozytären MHC-II Expression	106
5.3.1	STAT-3	107
5.3.2	STAT-1	107
5.3.3	Histonmodifikation - Acetylierung	108
5.3.4	Proteinkinase A.....	108
5.3.5	MAPK – Mitogen aktivierte Proteinkinasen.....	109
6.	Schlussfolgerung	111
	Literatur	113
	Anhang	122
	Veröffentlichungen	122
	Eidesstattliche Erklärung	123
	Danksagung	124

Zusammenfassung

Ein wesentliches Charakteristikum der Immundepression ist die sogenannte Monozytendeaktivierung mit verminderter Sekretion proinflammatorischer Zytokine und verminderter Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen gegenüber T-Zellen. Infolge der gehemmten zellulären Immunabwehr zeigen Patienten mit Immundepression eine stark erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen. Als mögliche Mediatoren einer Immundepression werden immunmodulatorische Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10), Prostaglandin und Transforming growth factor- β (TGF- β) diskutiert. Z.B. hemmt das antiinflammatorische Zytokin IL-10 die Antigenpräsentation von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und wirkt inhibierend auf die Expression des proinflammatorischen Tumornekrosefaktors- α (TNF- α). Die IL-10-vermittelte Hemmung der Antigenpräsentation und Zytokinsynthese ist jedoch nach Entfernen des Zytokins schnell reversibel. Bei der Entwicklung einer langanhaltenden Immundepression müssen daher weitere Mediatoren eine Rolle spielen. In einer Studie mit Patienten mit infektiösen Komplikationen nach Herz-Operationen wurde beobachtet, dass eine Überexpression des Hitzeschockproteins 32 (HSP-32) Hämoxxygenase-1 (HO-1) in peripheren Blutleukozyten mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen assoziiert ist. In zahlreichen Tiermodellen wurden antiinflammatorische Wirkungen der HO-1 gezeigt, die zu einem Schutz vor entzündungsbedingter Zellschädigung z.B. im Rahmen eines Endotoxin-Schocks oder nach Organ-Ischämie/Reperfusion führen. Während die immuninhibitorischen Effekte von HO-1 protektiv im Verlauf akuter Entzündungsreaktionen sind, könnte auf der anderen Seite eine verstärkte HO-1-Expression zu einer inadäquaten Hemmung der antimikrobiellen Immunabwehr führen.

HO-1 lässt sich ausschließlich in APCs, wie z.B. Monozyten, induzieren. Die mittels Porphyrine wie CoPP (Cobalt-Protoporphyrin) und Hämin induzierte HO-1 Überexpression korreliert mit einer verminderten Expression von MHC-II (Haupthistokompatibilitätskomplex) Molekülen. Der Effekt ist sowohl MHC- als auch Zell-spezifisch. Allerdings kann eine Hemmung der HO-1-Expression durch spezifische siRNA die Porphyrin-vermittelte Hemmung der MHC-II-Expression nicht aufheben. Die verwendeten HO-1-Induktoren CoPP und Hämin beeinflussen die Antigenpräsentation daher mittels HO-1-unabhängiger Mechanismen.

Sowohl die konstitutive als auch Interferon- γ -induzierte Expression von HLA-DR und CIITA werden durch eine Porphyrin-Behandlung gehemmt. Die Suppression der induzierten CIITA-Expression korreliert zudem mit einer verminderten Interferon- γ -induzierten STAT-1-Phosphorylierung, welche essentiell für die IFN- γ -induzierte CIITA Expression ist. Die Hemmung der konstitutiven CIITA- und MHC-II-Expression lässt sich damit jedoch nicht erklären, da konstitutiv kaum eine Phosphorylierung von STAT-1 zu detektieren war. Die Porphyrin-induzierte

Hemmung der konstitutiven MHC-II Expression ist weder von einer STAT-3-Aktivierung noch von einer verstärkten Histonacetylierung oder PKA-Aktivierung abhängig. Die gezeigten Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass die Porphyrin-Effekte nicht über eine Interaktion mit dem Hämoglobin-Scavenger Rezeptor CD163 induziert werden, da ein Blockieren der Hämoglobin-Haptoglobin-Bindedomäne die MHC-II hemmende Wirkung der Porphyrine nicht aufhebt.

Zweifellos haben Porphyrine weitreichende immunmodulatorische Eigenschaften. Durch die Hemmung der konstitutiven und induzierten MHC-II-Expression sind sie in der Lage, die antigenpräsentierende Funktion von myeloiden APCs soweit herabzusetzen, dass diese die Induktion einer adäquaten zellulären Immunantwort im Rahmen einer Infektion nicht mehr induzieren können. Das molekularbiologische Verständnis dieser Porphyrin-induzierten Mechanismen kann daher innovative Möglichkeiten bei der Entwicklung neuer Therapieansätze bei Immundepression bieten.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
ca.	circa
CBA	Cytometric Bead Assay
CD	„Cluster of Differentiation“
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
CoPP	Cobalt-Protoporphyrin IX
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ERK	extracellular signal related Kinase
et al.	et alii
FACS	Fluorescent activated cell sorter
Fitc	Fluoresceinthiocyanat
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
Hg	Haptoglobin
HLA	Humanes Leukocytenantigen
HO-1	Hämoxygenase-1
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
IE1	Immediate early protein
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

JAK	Janus Kinase
JNK	cJun-terminale Kinase
kDA	Kilo-Dalton
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molar = mol/l
MACS	Magnet associated cell sorter
MDDC	monocyte derived dendritic cell
MEK	MAPK/ERK Kinase
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
O ₂	Sauerstoff
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
pg	Pikogramm
PHA	Phytohemagglutinin
PRR	Pattern-recognition-receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
siRNA	Small interference RNA
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta

T _H	T-Helfer
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Verletzungen und Infektionen induzieren in der Regel eine Entzündungsreaktion in deren Verlauf eingedrungene Erreger eliminiert und Wundheilungsprozesse induziert werden. In der Klinik beobachtet man jedoch oft, dass manche Patienten nach langwierigen Operationen, Verbrennungen und/oder Trauma besonders anfällig gegenüber Komplikationen wie Wundheilungsstörungen und sekundären Infektionen sind. Heute weiß man, dass eine ausgeprägte, langanhaltende Immundepression eine wesentliche Ursache dieser Komplikationen ist.

Charakterisiert ist eine Immundepression durch einen Funktionsverlust von Monozyten. Dabei schützt die verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine den Körper zwar vor Zytokin-induzierten Gewebeschädigungen, durch die stark gehemmte Expression von MHC-II-Molekülen ist jedoch die antigenabhängige Aktivierung von T-Zellen stark vermindert. Bei einer lang anhaltenden Hemmung der Immunantwort steigt daher die Gefahr von sekundären Infektionen und Komplikationen. Die molekularen Ursachen, warum sich in manchen Patienten eine Immundepression manifestiert, während andere Patienten, mit gleicher Ausgangslage ohne Komplikationen genesen, ist jedoch bis heute ungeklärt.

Als ein möglicher Mediator einer langanhaltenden Immundepression wird u.a. das Hitzeschockprotein Hämoxxygenase-1 (HO-1) diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der Hämoxxygenase-1 im Hinblick auf eine Monozytendeaktivierung genauer analysiert.

1.1 Klinische Bedeutung der Immundepression

Eine Einschränkung der Immunreaktion (Immundepression) kann, genau wie ein Überschießen der Immunantwort, weitreichende Folgen für den Genesungsprozess des Patienten haben. Bei einer ausgeprägten Immundepression ist die inflammatorische Abwehrreaktion so stark eingeschränkt, dass der Körper nicht mehr adäquat auf vorhandene oder eindringende Erreger reagieren kann. Unkontrollierte Infektionen mit starken Gewebeschädigungen bis hin zum Multiorganversagen können die Folge sein, wodurch sich die Prognose dieser Patienten verschlechtert und es zu einem Anstieg der Mortalität kommt.

Ursache für die Entwicklung einer Immundepression können systemische Entzündungsreaktionen (SIRS) auf Grund von Infektionen (Sepsis) oder sterilen Gewebeschädigungen (z.B. nach großen Operationen, Verbrennungen oder Traumata) sein. Ähnlich wie bei einer lokalen Entzündung induzieren bei einer systemischen Entzündungsreaktion proinflammatorische Zytokine wie TNF-(Tumornekrosefaktor)- α , IL-(Interleukin)-1 β und IL-6 die systemische Freisetzung

entzündungshemmender Mediatoren wie IL-10 und TGF-(Transforming growth factor)- β . Zeitgleich kommt es zu einer Aktivierung der neurohumoralen Stressachsen, wodurch die Freisetzung weiterer antiinflammatorischer Mediatoren wie Katecholamine und Kortisol induziert werden. Die Folge ist einer systemischen Hemmung der zellulären Immunantwort.

Eine Immundepression kann sich jedoch auch ohne vorangehende Entzündungsreaktion entwickeln. Massive Gewebsapoptose (z.B. bei akutem Leberversagen) oder allgemeine Stresssituationen, wie nach Schädel-Hirntrauma und Schlaganfall, können durch Aktivierung der neurohumoralen Stressachsen zu einer systemischen Hemmung der Immunantwort, bis hin zu einer Immundepression, führen [1] .

Für eine adäquate Behandlung ist es essentiell den Immunstatus des Patienten richtig einzuordnen. Ein septischer Patient in der hyperinflammatorischen Phase könnte dann durch eine immunhemmende Therapie und ein Patient in der immundepressiven Phase durch eine immunstimulierende Therapie erfolgreich behandelt werden [2] . Um hier einen klinischen Standard zu etablieren fehlen bisher jedoch größere Studien. Für eine schnelle und verlässliche Erfassung der Immunkompetenz eignet sich die Messung der monozytären HLA-DR-Expression, wobei ein Wert von <5000 HLA-DR-Moleküle / $CD14^+$ Zelle (Monozyten) Ausdruck einer schweren Immundepression (Immunparalyse) ist [3] . Eine aktuelle Studie mit Intensiv-Patienten, welche einen SAPS II (Simplified Acute Physiology Score, [4] ^a) >15 aufweisen, zeigt, dass besonders eine langanhaltende Hemmung der HLA-DR-Expression mit einem hohen Risiko sekundärer Infektionen assoziiert ist [5] . Des Weiteren ist die *ex-vivo*-Fähigkeit von Blutmonozyten aus immundepressiven Patienten nach Stimulation mit Endotoxin $TNF-\alpha$ zu produzieren stark herabgesetzt. Die kritische Grenze für die Diagnose „Immundepression / Immunparalyse“ scheint dabei bei $<300\text{pg/ml}$ $TNF-\alpha$ nach 4h Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation zu sein. Gesunde Probanden produzieren im Vergleich $500\text{-}2500\text{pg/ml}$ $TNF-\alpha$ [6] .

Bei der Behandlung von Patienten mit Immundepression zeigen Studien, dass immunstimulierende Mediatoren wie Interferon- γ ($IFN-\gamma$) [7,8] und GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) [7,9] durch die Induktion der HLA-DR-Expression eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz spielen. Um schon frühzeitig der Entwicklung einer langanhaltenden Hemmung des Immunsystems entgegen zu

^a SAPS II ist ein Punktwert, der den medizinischen Status eines Patienten einschätzt. Dabei sind neben Alter und Geschlecht besonders physiologische (u.a. Körpertemperatur, Herzfrequenz) und medizinische (u.a. Verletzungs-, Krankheitsgrad, medizinische Vorgeschichte, Beatmung, Blutwerte) Daten/Werte für die Erstellung des SAPS II-Wertes von hoher Relevanz.

wirken, ist jedoch das Wissen über die genauen molekularen Ursachen einer langanhaltenden Immundepression essentiell.

1.2 Das Prinzip des Immunsystems

Um sich gegen Infektionen zu schützen besitzt der Mensch ein komplex reguliertes, körpereigenes Abwehrsystem. Den Erregern wird zum einen durch mechanische und chemische (z.B. pH-Wert) Barrieren wie Haut und Schleimhaut das Eindringen in den Körper erschwert und zum anderen werden eingedrungene Erreger durch ein effektives zelluläres Abwehrsystem bekämpft. Sollte es den Erregern gelungen sein die mechanische/chemische Barriere zu durchdringen, werden die Pathogene von den Zellen der angeborenen Immunabwehr (Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC)) mittels spezifischer Rezeptoren erkannt und phagozytiert. Die zu den Mustererkennungsrezeptoren (PRR, pattern recognition receptore) gehörenden Rezeptoren erkennen konservierte Strukturen (z.B. Oberflächenmoleküle, bakterielle DNA) von Pathogenen, sogenannte PAMPs (pathogen associated molecular pattern). Zudem unterscheidet man Fc-Rezeptoren, welche mit Antikörpern markierte Pathogene erkennen. Durch die Interaktion von Pathogen/Pathogenbestandteil und Rezeptor wird die Zelle aktiviert und setzt zellspezifisch u.a. Histamine, Proteasen und TNF- α frei, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion induziert wird. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind, im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem, unspezifisch, also nicht gegen einen speziellen Erreger gerichtet. Die Rezeptorspezifität der PRRs und Fc-Rezeptoren ist durch die Keimbahn kodiert und somit nicht variabel. Dies hat den Vorteil, dass die Erkennung von Strukturen, welche in der Regel für das Überleben der Erreger essentiell sind, weiter vererbt werden und so ein Schutz gegen eine Vielzahl verbreiteter Erreger gewährleistet wird. Da das angeborene Immunsystem jedoch ausschließlich unspezifische PAMPs erkennt, kann es keinen pathogenspezifischen Schutz gegen eine erneute Infektion liefern (kein immunologisches Gedächtnis). Neben der Initiierung einer Entzündungsreaktion sind die Zellen der angeborenen Immunantwort in der Lage durch Präsentation von Pathogenbestandteilen auf MHC-Molekülen (Haupthistokompatibilitätskomplex) die Zellen der adaptiven Immunantwort zu aktivieren. Somit spielen die Zellen des angeborenen Immunsystems nicht nur bei der schnellen, aber unspezifischen, Kontrolle von Infektionen eine kritische Rolle, sondern auch bei der Aktivierung der spezifischen, adaptiven Immunantwort, die in der Regel vier bis fünf Tage nach Eindringen des Pathogens anläuft [10].

Die Zellen der adaptiven Immunantwort lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen unterteilen. Die B-Zellen, welche für eine humorale Immunantwort essentiell sind, erkennen mit ihren B-Zell-Rezeptoren (BCR) lösliche Antigene und Differenzieren nach Aktivierung zu Plasmazellen und sezernieren (pathogen-)spezifische Antikörper. T-Zellen sind als CD8⁺ T-Zellen für die zellvermittelte Immunität und als CD4⁺ T_H-Zellen für die Induktion der humoralen

Immunantwort (Aktivierung von B-Zellen, Induktion der Antikörperproduktion) verantwortlich. Beide Populationen zirkulieren im Blut und kommen in großer Anzahl in den lymphatischen Organen vor. Daneben unterscheidet man eine weiter kleine T-Zell-Subpopulation, die $\gamma\delta$ -T-Zellen. Diese unterscheiden sich durch ihren T-Zell-Rezeptor von den anderen ($\alpha\beta$ -)T-Zellen. Allerdings ist die Funktion dieser CD8- und CD4-negativen T-Zell-Subpopulation bis heute nicht genau geklärt. Man nimmt an, dass sie zum einen bei der schnellen Immunantwort und bei der Vernichtung entarteter Zellen eine Rolle spielen, und zum anderen für die Regulation der Immunantwort von Bedeutung sind [11,12,13] .

Die Antigenrezeptoren von T- und B-Zellen (und die von B-Zellen produzierten Antikörper) weisen eine enorme Varianz auf. Dies gewährleistet eine sehr hohe Diversität in der spezifischen Erkennung von Pathogenen. Diese Diversität wird durch somatische Rekombination^b der Rezeptorgensequenzen erreicht. Die Spezifität der Rezeptoren ist demnach, im Gegensatz zu der Spezifität der angeborenen Immunantwort, nicht in der Keimbahn festgelegt, sondern entwickelt sich in jedem Menschen neu.

Während B-Zellen ungebundene Fremdartigene erkennen, erfassen T-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) ausschließlich auf MHC-Molekülen präsentierte Antigene. Die Interaktion von T-Zelle und APC führt zu der Aktivierung der T-Zelle. Je nach Zelltyp unterscheidet sich dabei die durch Aktivierung ausgelöste Reaktion. Während CD8-T-Zellen in der Regel die Apoptose der Zielzellen induzieren, entwickeln sich CD4-Zellen nach Aktivierung z.B. in $T_{\text{Helfer(H)}}1$ - oder in $T_{\text{H}}2$ -Zellen. $T_{\text{H}}1$ -Zellen induzieren eine zelluläre Immunantwort, indem sie durch die Sekretion von IL-2, IFN- γ und TNF- α CD8-T-Zellen und Makrophagen aktivieren. $T_{\text{H}}2$ -Zellen sezernieren dagegen vermehrt u.a. IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und induzieren somit eine humorale Immunantwort (Aktivierung von B-Zellen, Induktion der Antikörperproduktion) [10] . Naive B-Zellen, welche mit ihrem B-Zell-Rezeptor (BCR) ein Fremdantigen erkannt haben, benötigen zur vollständigen Aktivierung einen costimulatorischen Reiz, welcher von aktivierten CD4- T_{H} -Zellen geliefert wird. Mit ihrem TCR erkennen die CD4-Zellen den Antigen-MHC-Komplex der B-Zellen und beeinflussen so die B-Zelle. Die CD4-T-Zellen lassen sich aufgrund ihrer spezifischen Marker und ihrem sezernierten Zytokinprofil in weitere Subpopulationen unterteilen ($T_{\text{H}}17$, Treg, $T_{\text{R}}1$) [14] . $T_{\text{H}}17$ -Zellen produzieren IL-17, TNF- α und GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating

^b Die somatische Rekombination ist ein Prozess bei dem es zu einer Umlagerung der Gensequenzen (DNA-Rearrangement) kommt. Sie betrifft nicht die Keinzellen und wird somit auch nicht vererbt. Die Diversität der Lymphozyten Antigen-Rezeptoren (T-Zell-Rezeptor und Immunglobuline der B-Zellen) wird durch eine variable (V) Region im Rezeptorprotein bestimmt, welche an eine konstante (C) Region anschließt, die für die Weiterleitung der Effektorfunktion zuständig ist. Bei der Entwicklung der Lymphozyten werden die Gene der V-Region umgelagert und neu arrangiert, wodurch es zu einer enormen Vielfältigkeit der Rezeptorspezifität kommt.

factor) und passen somit weder in das T_H1 - noch in das T_H2 -Schema [15] . Sie spielen jedoch eine kritische Rolle in der Abwehr extrazellulärer Pathogene wie Bakterien oder Pilze [14] . Daneben unterscheidet man die $CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$ regulatorischen T-Zellen (Treg), welche für die Regulation der Immunantwort gegenüber Fremdanitgenen, aber auch für die Suppression von Autoimmunreaktionen und der Erhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen von besonderer Bedeutung sind [16] . Zudem werden, die in der Peripherie aus naiven Vorläuferzellen entstehenden, T_R1 -Zellen von den Tregs unterschieden. Diese wirken durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β antiinflammatorisch und begrenzen so die Immunantwort [17] . Die Zellen der adaptiven Immunantwort sind zudem in der Lage durch Generierung langlebiger B- und T-Zellen ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen. Diese Memoryzellen behalten die nach Antigenkontakt ausgebildete Spezifität und bei erneutem Kontakt mit dem Antigen erfolgt eine schnelle Reaktivierung der Memoryzellen. Durch die Aktivierung wird ihre Proliferation angeregt und so sehr schnell eine pathogenspezifische Immunantwort induziert.

Übersicht 1 Die Zellen der Immunantwort

Alle zellulären Bestandteile des Blutes, inklusive der Immunzellen, entstammen pluripotenten hematopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Aus diesen entwickeln sich zwei Sub-Stammzell-Typen: die lymphoide Vorläuferzelle und die myeloide Vorläuferzelle. Zu den Zellen der angeborenen Immunität zählen im Wesentlichen die myeloiden Zellen wie Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile), Mastzellen, Monozyten (die zu Makrophagen oder MDDC [myeloide derived Dendritic cells] differenzieren können) DCs aber auch NK-Zellen. Zu den Zellen der adaptiven Immunantwort gehören T- und B-Zellen. Diese werden durch antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten, Makrophagen und DC aktiviert, so dass hier eine Interaktion zwischen angeborener und adaptiver Immunität besteht.

<u>Vorläuferzelle</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Vorkommen</u>	<u>Hauptaufgabe</u>
lymphoid	B-Zellen	Lymphknoten	Antikörper-Sekretion
	T-Zellen	Lymphknoten	CD8-Effektorzelle: Vernichtung infizierter Zellen CD4-Effektorzellen: Aktivierung von B-Zellen (AK-Produktion) und Makrophagen
	NK-Zellen	Lymphknoten	Vernichtung infizierter Zellen und Tumorzellen
myeloid	Neutrophile G.	Blutbahn/Gewebe	Phagozytieren von Bakterien
	Eosinophile G.	Blutbahn/Gewebe	allergische Entzündung, Abwehr von Parasiten
	Basophile G.	Blutbahn/Gewebe	allergische Entzündung, Abwehr von Parasiten
	Mastzellen	Blutbahn/Gewebe	allergische Reaktionen
	Monozyten	Blutbahn/Gewebe	Phagozytose und Antigenpräsentation, Differenzierung zu Makrophagen oder DC
	Makrophagen	Gewebe	Phagozytose und Antigenpräsentation
	DC	Blutbahn/Gewebe	Antigenpräsentation, Aktivierung von T-Zellen

Übersicht 1

1.2.1 Funktion von Monozyten

Die im Blut zirkulierenden Monozyten entstehen aus myelomonozytären Stammzellen des Knochenmarks, welche sich erst zu Monoblasten entwickeln und dann in Monozyten differenzieren [18]. Die Halbwertszeit der Monozyten im Blut beträgt 1-3 Tage. Während dieser Zeit können die Monozyten bei Antigenkontakt ins umliegende Gewebe migrieren und sich zu Makrophagen, welche ubiquitär in allen Geweben vorkommen (z.B. als Peritonealmakrophagen im Bauchraum, als Alveolarmakrophagen in der Lunge oder als Kupffer-Zellen in der Leber), differenzieren.

Monozyten exprimieren eine Vielzahl verschiedener PRRs, mit denen sie Pathogene und Pathogenbestandteile erkennen. Dazu zählen u.a. Scavenger Rezeptoren („Fress-Rezeptoren“), welche LDL (low-density-lipoprotein) und anionische Polymere erkennen, Mannose- und Glukanrezeptoren, welche spezifische Kohlenhydrate erkennen, sowie Toll-like-Rezeptoren (TLR-2 und 4), welche LTA (Lipoteichonsäure) und LPS (Lipopolysaccharid) erkennen. Nach Erkennung der Pathogenbestandteile durch die entsprechenden Rezeptoren phagozytieren Monozyten die Erreger. Zugleich produzieren aktivierte Monozyten/Makrophagen verschiedene proinflammatorische Mediatoren (z.B. IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α). Durch die Freisetzung von TNF- α und IL-6, aber auch durch die Induktion von Prostaglandin, Histamin (typischerweise produziert von Mastzellen und basophile Zellen) und der enzymatischen Freisetzung von Bradykinin wird eine Entzündungsreaktion mit den typischen Kardinalsymptomen (Rötung, Erwärmung des Gewebes, Schwellung, Schmerz, Funktionsstörung) initiiert. Prostaglandin und Histamin führen zu einer kurzzeitigen Verengung der Blutgefäße, während gleichzeitig ihre Permeabilität gesteigert wird, so dass es zu einer Ansammlung von Plasma kommt und Immunzellen leichter in das umliegende Gewebe migrieren können. Durch Ödembildung und Entzündungsprodukte, wie Bradykinin, werden die Schmerzrezeptoren gereizt. Schmerz und Ödem resultieren dann in einer gestörten Funktion des betroffenen Bereiches. Die proinflammatorischen Mediatoren wirken zudem aktivierend auf weitere Immunzellen. IL-8 wirkt z.B. chemotaktisch auf Phagozyten und steigert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, während das von DCs und Makrophagen produzierte Zytokin IL-12 naive T-Zellen im Lymphknoten beeinflusst. Die proinflammatorischen Zytokine stimulieren außerdem die Synthese antiinflammatorischer Mediatoren, wodurch die Entzündungsreaktion eingedämmt wird und sich normalerweise selbst reguliert. Das entzündungsfördernde TNF- α induziert z.B. über parakrine und autokrine Mechanismen die Synthese des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. [19,20]

Neben der Initiierung einer Entzündungsreaktion sind Monozyten in der Lage die aufgenommenen Erregerbestandteile zu prozessieren und mittels MHC-II Molekülen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Damit können Monozyten, neben Makrophagen und DC, als antigenpräsentierende Zellen agieren und die Induktion einer adaptiven Immunantwort initiieren. [10]

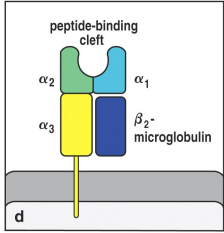
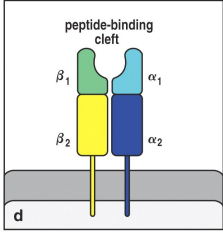
1.2.2 Aktivierung von Lymphozyten durch Antigenpräsentation

Als Hauptaktivatoren von T-Lymphozyten gelten DCs. Aber auch Monozyten und Makrophagen sind durch Antigenpräsentation in der Lage die T-Zellen zu aktivieren. Während Monozyten/Makrophagen nach Aktivierung am Infektionsort bleiben, wandern aktivierte DCs über die Lymphbahn zu den Lymphknoten. Hier treffen sie auf eine Vielzahl naiver T-Lymphozyten. Die T-Zellen scannen mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) den MHC-Antigenkomplex der antigenpräsentierenden Zelle (APC). Wenn TCR und MHC-Antigenkomplex zusammenpassen („Schlüssel-Schloss-Prinzip“) kommt es zur Interaktion. Zur vollständigen Aktivierung benötigen die T-Zellen jedoch die zusätzliche Stimulation durch Corezeptoren wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), welche nach Aktivierung verstärkt auf den APCs exprimiert werden. Durch diese antigenspezifische Aktivierung der T-Zellen wird die Proliferation dieser T-Zellen angeregt. Geleitet durch die von Monozyten/Makrophagen ausgeschütteten Zytokine und Chemokine wandern die T-Zellen anschließend über die Blutgefäße zum Infektionsort und bekämpfen dort als Effektorzellen den eingedrungenen Erreger. Monozyten/Makrophagen sind zudem in der Lage im Blut zirkulierende naive oder Gedächtnis-T-Zellen zu aktivieren, so dass die Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen auch am Infektionsherd induziert wird. Dies fördert die schnelle Induktion einer pathogenspezifischen Immunantwort.

Bei den von APCs exprimierten MHC-Molekülen unterscheidet man zwei Klassen. Das MHC-I-Molekül präsentiert hauptsächlich intrazellulär produzierte Antigene (z.B. virale Proteine) und wird von CD8-T-Zellen erkannt. Das MHC-II-Molekül, welches mit CD4-T-Zellen interagiert, präsentiert dagegen extrazelluläre, durch Endozytose aufgenommene und prozessierte Antigene. Aktivierte CD8-T-Zellen fungieren als cytotoxische Zellen. Durch Stimulation des Fas-Rezeptors und Freisetzung von Perforin und Granzymen induzieren sie die Apoptose der Zielzelle. Hierdurch wird gewährleistet, dass infizierte Zellen (oder entartete Zellen [Tumorzellen]) vernichtet werden. Die über MHC-II aktivierten CD4-T-Zellen fungieren als T-Helfer-Zellen, indem sie die antigenpräsentierende Zelle aktivieren und so in Makrophagen die Phagozytose bzw. in B-Zellen die Antikörperproduktion induzieren (Kap.1.2, Übersicht 2). Während MHC-I Moleküle auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert werden, ist die Synthese von MHC-II Molekülen auf spezielle, antigenpräsentierende Zellen festgelegt. Konstitutiv exprimieren ausschließlich DC, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen MHC-II-Moleküle.

Die Annahme, dass MHC-I-Moleküle ausschließlich intrazelluläre Antigene und MHC-II-Moleküle nur extrazelluläre Antigene präsentieren, ist jedoch veraltet. Insbesondere in DCs, die sowohl MHC-I als auch MHC-II-Moleküle exprimieren, kann es zu einer Kreuzpräsentation kommen. Dabei werden extrazelluläre Antigene nicht nur auf MHC-Klasse-II sondern auch auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. Der genaue Mechanismus der Kreuzpräsentation ist jedoch unklar. Es

wird vermutet, dass Fremd-Antigene von apoptotischen oder nekrotischen Zellen durch Phagozytose (oder Mikropinozytose) aufgenommen werden und anschließend auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden können [21] .

Übersicht 2 MHC-I und MHC-II- Moleküle		
	MHC-I 	MHC-II 
Vorkommen	Auf allen kernhaltigen Zellen (außer Neuronen)	Monozyten, Makrophagen, DC, B-Zellen
Genlokalisierung	Chromosom 6 (β-Mikroglobulin auf Chr. 15)	Chromosom 6
Peptidbindung	geschlossene Bindetasche Intrazelluläre (cytosolische) Peptide, z.B. Virusbestandteile, prozessiert durch Immunoproteasom Kurze Peptide (8-10 AS)	offene Bindetasche Extrazelluläre Peptide, aufgenommen durch Phago-, Pinozytose, prozessiert durch Cathepsine Längere Peptide (>13 AS)
Interaktion mit	CD8-T-Zellen (Cytotoxische T-Zellen)	CD4-T-Zellen (T _H -Zellen)
Corezeptor	auf APC: CD80 (=B7.1), CD86 (=B7.2), Fas-Rezeptor auf T-Zelle: CD28, CD8, Fas-Ligand	auf APC: CD80 (=B7.1), CD86 (=B7.2), CD40 auf T-Zelle: CD28, CD4, CD40-Ligand
Effekt auf präsentierende Zelle	Zelltod	T _H 1-Zellen: Aktivierung von Makrophagen, Vernichtung der aufgenommenen Erreger T _H 2-Zellen: B-Zellen, Produktion von Immunglobulinen

Übersicht 2 (Abbildungen MHC-I und MHC-II aus [10])

1.3 Fehlregulation des Immunsystems - die Immundepression

In der Klinik wird oft beobachtet, dass es in Folge von Verletzungen/Trauma und/oder Infektionen zu einer Fehlregulation des Immunsystems kommen kann. Dies hat meist weitreichende Folgen auf den Genesungsprozess des Patienten.

Gelingt es dem Körper nicht, eine Infektion lokal zu begrenzen, kann es zu einer systemischen Entzündungsreaktion (Hyperinflammation) kommen. Durch die massive Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und IL-6 werden systemisch wirksame Konzentrationen erreicht, durch die es zu einer systemischen Aktivierung von Monozyten und Makrophagen kommt

(systemische Entzündungsreaktion). Fieber, Tachykardie (erhöhter Herzfrequenz), Hypotension (erniedrigtem Blutdruck) und die Freisetzung unspezifischer Immunzellen wie Monozyten und Granulozyten aus dem Knochenmark sind die Folge [6,22] . Gleichzeitig steigt die Gefahr von TNF- α -induzierten Gewebeschädigungen [23,24] . Bei ausgeprägten systemischen Entzündungsreaktionen, bei denen sich aus einer eigentlich protektiven Immunantwort eine pathophysiologische Situation entwickelt, spricht man in der Klinik von SIRS (systemic inflammatory response syndrom). Insbesondere das infektiös verursachte SIRS (Sepsis) ist durch die Entwicklung eines septischen Schocks bis hin zum Multiorganversagen mit einer hohen Mortalität verbunden.

Ähnlich wie eine lokale Entzündung eine antiinflammatorische Gegenregulation hervorruft, induziert eine systemische Entzündungsreaktion eine systemische kompensatorische antiinflammatorische Antwort (CARS = compensatory antiinflammatory response syndrome) [25] . Diese Hypoinflammation ist gekennzeichnet durch die verstärkte systemische Freisetzung von IL-10, TGF- β und Prostaglandin. Zudem induzieren proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β eine systemische Stressreaktion im zentralen Nervensystem (ZNS). Durch Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und des sympathischen Nervensystems kommt es zur Freisetzung neuronaler Stressmediatoren wie Glukokortikoide und Katecholamine, welche ebenfalls zu einer Hemmung der Entzündungsreaktion beitragen [6] .

Im Patienten beobachtet man, dass Hyper- und Hypoinflammation auch parallel vorkommen können. So kann systemisch eine Hypoinflammation mit hohen IL-10- und niedrigen TNF- α -Werten diagnostiziert werden, gleichzeitig aber auch eine lokale Entzündungsreaktion mit gesteigerter Expression proinflammatorischer Mediatoren auftreten (MARS = mixed antagonist response syndrome). In den meisten Fällen pendeln sich Hyper- und Hypoinflammation mit der Zeit wieder auf ein normales Niveau ein. Allerdings zeigen manche Patienten eine langanhaltend verminderte Immunantwort (Immundepression). Diese ausgeprägte Form der Immundepression bezeichnet man auch als Immunparalyse. Sie ist durch eine starke Einschränkung der zellulären Immunantwort gekennzeichnet, wobei insbesondere die antigenpräsentierende Funktion der Monozyten stark vermindert ist [26,27,28] . Man konnte zeigen, dass eine langanhaltend verminderte Expression von MHC-II mit einem erhöhten Risiko sekundärer Infektionen assoziiert ist. Darauf deutet eine Studie mit Patienten nach neurochirurgischen Eingriffen. Patienten mit infektiösen Komplikationen zeigten kurz nach der Operation eine stark verminderte MHC-II Expression auf ihren peripheren Blutleukozyten im Vergleich zu Patienten ohne Komplikationen [29] . Auch in Patienten mit Sepsis kann ein Funktionsverlust der Monozyten die Prognose des Patienten drastisch verschlechtern [30] . Der massive Verlust von HLA-DR Molekülen gilt dabei auch als verlässlicher diagnostischer Marker für eine Immundepression (< 15000 HLA-DR Moleküle/CD14 $^{+}$ Zelle) bzw. Immunparalyse (< 5000

HLA-DR Moleküle/CD14+ Zelle) [31] . Zudem sind Monozyten, deren MHC-II Expression stark vermindert ist, nur noch eingeschränkt in der Lage proinflammatorische Zytokine wie TNF- α nach Endotoxinstimulation zu produzieren [28] . Diese systemische Antiinflammation schützt den Körper zwar vor entzündungsbedingten Zellschädigungen, allerdings ist bei einer schweren Immundepression die adäquate Immunabwehr gegen vorhandene oder eindringende Erreger stark eingeschränkt.

Eine langanhaltende Antiinflammation kann sich auch ohne vorangegangene Entzündungsreaktion manifestieren. Massive Gewebeapoptose (z.B. akutes Leberversagen) oder allgemeine Stressreaktionen (z.B. Herzinfarkt, Schlaganfall, Trauma) induzieren durch die Aktivierung der neuronalen Stressachse eine systemische Hemmung des Immunsystems, was in schweren Fällen in einer langanhaltenden Immundepression resultieren kann.

In Abb. 1 wird der Entstehungsmechanismus einer systemischen Immundepression schematisch dargestellt. Durch parakrine und autokrine Mechanismen der proinflammatorischen Zytokine wie TNF- α und IL-1 β kommt es zu einer negativen Rückkopplung, bei der es zu einer starken Induktion antiinflammatorischer Mediatoren kommt. Zudem wird die Synthese entzündungshemmender neurohumoraler Stressmediatoren wie Katecholamine und Kortisol induziert. Beides zusammen bewirkt, dass Monozyten bzw. Makrophagen von einem proinflammatorischen Reaktionsmuster in ein antiinflammatorisches Muster wechseln.

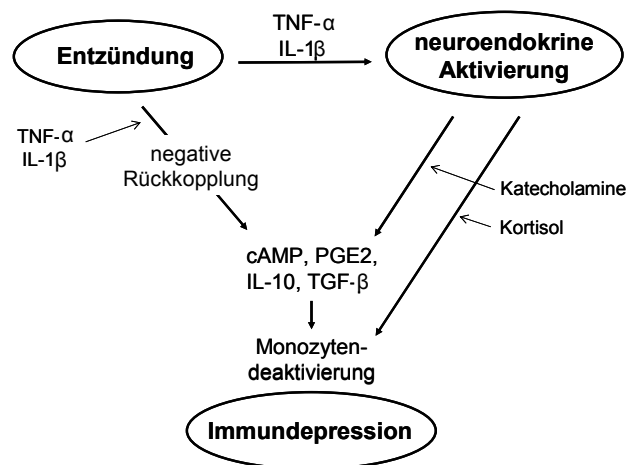


Abb. 1 Schema der Entwicklung einer Immundepression [22]

Durch systemische Entzündungsreaktionen, verursacht z.B. durch Trauma, Verletzungen oder Infektionen kommt es zu einer Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β . Durch neuronale Aktivierung und einer negativen Rückkopplung wird dann eine antiinflammatorische Gegenreaktion induziert, bei der u.a. große Mengen an IL-10 und TGF- β freigesetzt werden. Zusammen resultiert dies in einer Hemmung der zellvermittelten Immunantwort (Immundepression).

1.3.1 Immunmodulatorische Mediatoren der Immundepression

Als mögliche Mediatoren einer langanhaltenden Immundepression werden hauptsächlich antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, TGF- β und Prostaglandin diskutiert.

In einer Studie mit Sepsis-Patienten zeigte sich, dass gesteigerte IL-10-mRNA Level in peripheren Blutleukozyten innerhalb der ersten 24h nach Aufnahme auf die Intensivstation mit einer drei Tage später detektierten verminderten MHC-II-Expression auf Monozyten korrelieren [32]. Plasma aus Patienten mit septischem Schock konnte zudem in Monozyten gesunder Probanden *in vitro* die Endozytose von MHC-II-Molekülen induzieren. Die Folge war eine verminderte monozytäre MHC-II-Expression. Dieser Effekt war abhängig von IL-10 und konnte durch Neutralisation des antiinflammatorischen Zytokins aufgehoben werden [33]. Eine Studie mit Psoriasis-Patienten, denen subkutan IL-10 verabreicht wurde, deutet jedoch darauf hin, dass die durch IL-10 vermittelte Suppression der Antigenpräsentation eher temporär ist. Während der Behandlung kam es zwar zu einer der Immundepression typischen Verminderung der monozytären HLA-DR-Expression, sowie einer reduzierten ex vivo LPS-induzierten TNF- α Sekretion, dieser Effekt war jedoch nach Behandlungsende schnell reversibel [34]. Zudem weist auch ein Vergleich zwischen einem LPS-Desensibilisierungsmodell und einer IL-10-induzierten Hemmung der Monozytenfunktion auf einen nur kurzzeitigen Effekt von IL-10 hin. Eine Vorbehandlung von Monozyten mit LPS resultierte in einer langanhaltenden verminderten LPS-induzierten TNF- α Expression, während die IL-10-vermittelte Hemmung der LPS-induzierten Zytokinproduktion schnell reversibel war. Auch die durch IL-10 verminderte MHC-II-Expression war nur temporär, während die LPS-vermittelte Hemmung auch 48h nach LPS-Vorbehandlung zu detektieren war [35]. Die Desensibilisierung von Monozyten durch LPS scheint daher ein gutes Modell für die eingeschränkte Monozytenfunktion im Rahmen einer Immundepression zu sein.

Das zu den antiinflammatorischen Zytokinen gehörende TGF- β wird als weiterer Mediator einer langanhaltenden Immunsuppression diskutiert. TGF- β hemmt sowohl die Aktivierung von Makrophagen, als auch die Proliferation von B- und T-Zellen [10]. Eine Studie mit humanen Zellen zeigt, dass eine Behandlung von MDDCs (monocyte derived dendritic cell) mit physiologisch relevanten TGF- β Konzentrationen die LPS-induzierte Reifung der Zellen hemmt, wodurch ihre Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren vermindert wurde [36]. Auf eine Korrelation zwischen erhöhten TGF- β -Werten und verminderter Antigenpräsentation deutet auch eine Mausstudie hin. Die Tiere wiesen bis zu 72h nach einem experimentell herbeigeführten Blutdruckabfall einen erhöhten TGF- β -Level auf, was mit einer verminderten mitogen-abhängigen T-Zellaktivierung und einer verminderten Antigenpräsentation assoziiert war [37].

Als weiterer Mediator einer Immundepression wird Prostaglandin E (PGE) diskutiert. PGE wird von Monozyten und Makrophagen nach Aktivierung über die PRRs produziert. Es hemmt u.a. die Produktion proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-2) von T-Zellen [38]. In Peritonealmakrophagen

der Maus konnte die Gabe von PGE die LPS-induzierten TNF- α - Synthese vermindern. Es wurde gezeigt, dass der hemmende Effekt von der durch PGE-induzierten IL-10-Expression abhängig war, da durch Neutralisation von IL-10 mit einem spezifischen Antikörper die PGE-vermittelten Effekte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* aufgehoben werden konnten [39] . PGE ist jedoch durch Aktivierung der Adenylatcyclase, wodurch es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt [40] , in der Lage, die TNF- α -Expression auch unabhängig von IL-10 zu inhibieren [41,42] .

Die bisher veröffentlichten Daten deuten darauf hin, dass die diskutierten Mediatoren IL-10, TGF- β und PGE zwar die Funktion von APC hemmen können, ihre Effekte aber in der Regel schnell reversibel sind und sie daher wahrscheinlich nicht alleine zur Etablierung einer langanhaltenden Immundepression ausreichen.

So bleibt es trotz vieler neuer Erkenntnisse über die Entwicklungsmechanismus einer temporären Immundepression (Abb. 1) letztlich weiterhin unklar, warum es in manchen Patienten zur Manifestation einer langanhaltenden Hemmung des Immunsystems kommt, während sich andere Patienten mit gleicher Ausgangslage ohne Komplikationen erholen.

Im Rahmen einer Immunmonitoring-Studie in kardio-chirurgischen Patienten zeigte sich mittels Genexpressionsanalyse ein neuer potentieller Mediator für die Manifestierung einer langanhaltenden Immundepression. Die Studie weist auf eine Korrelation zwischen einem erhöhten Hämoxygenase-1 (HO-1) mRNA-Level und der Entwicklung infektiöser Komplikationen hin. So konnte in den Patienten, in denen sich postoperativ Infektionen manifestierten, im Vergleich zu Patienten mit unkompliziertem Verlauf am ersten Tag nach der Operation eine gesteigerte HO-1-Expression in peripheren Blutleukozyten nachgewiesen werden ([3] , H.D. Volk, unveröffentlichte Daten)

In den letzten Jahren wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Vielzahl protektiver, antiinflammatorischer HO-1-Effekte beschrieben. Zahlreiche Tiermodell-Studien, insbesondere Ischämie/Reperfusion- und Transplantationsmodelle, weisen auf entzündungshemmende Eigenschaften von HO-1 und seinen Produkten hin [43,44,45] . Einen Beweis für die Bedeutung von HO-1 bei der Kontrolle von Entzündungsreaktionen sieht man bei HO-1-defizienten Mäusen. Diese Tiere zeigen Eisenablagerungen in Leber und Milz, schwere chronische Entzündungen, Gewebeerstörung und eine verstärkte Apoptose bei oxidativem und inflammatorischem Stress. Zudem kommt es bei der Vermehrung heterozygoter HO-1^{+/-}-Mäuse sehr häufig zu einem entzündungsbedingten Absterben der Föten [46,47] . Eigene Daten zeigen, dass eine induzierte HO-1-Hochregulation die Reifung von humanen MDDC hemmt und somit durch Suppression von HLA-DR und costimulatorischen Molekülen die Funktion der MDDCs einschränkt [48] . Dass HO-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungen spielt, zeigt auch eindrucksvoll der erste

bekannte Fall einer HO-1-Defizienz im Menschen. Der Junge litt unter Wachstumsstörungen, Anämie, Eisenablagerungen und schweren Entzündungen der Leber und Niere und verstarb im Alter von 6 Jahren [49,50] .

1.4 Die Hämoxygenase

Die zu den Hitzeschockproteinen gehörende Hämoxygenase-1 (HO-1) wurde erstmalig 1968 von Tenhunen et al. beschrieben [51] . HO-1 gilt als limitierendes Enzym des Hämoglobinabbaus [51,52] . Bis heute sind drei Isoformen (HO-1, -2, -3) bekannt, wobei die drei Isoenzyme von unterschiedlichen Genen kodiert und in unterschiedlichen Geweben lokalisiert sind. HO-3 (HSP36) wurde bisher in Milz und Leber, im Thymus, in der Prostata, im Myokard, in den Nieren, im Zentralnervensystem und in den Hoden nachgewiesen [53] . HO-2 (HSP34) wurde vor allem in Neuronen lokalisiert [54] . HO-1 wird sehr stark in Leber und Milz exprimiert und ist in vielen Zelltypen (z.B. Monozyten/Makrophagen) durch ihr Substrat (Hämprotein), aber auch durch synthetische Protoporphyrine und zellulären Stress (z.B. UV-Licht, immunologischen Stress) induzierbar. Das Enzym katalysiert den Abbau von freiem Hämprotein (Ferro-(Fe²⁺)-protoporphyrin IX) zu Biliverdin, wobei gleichzeitig äquimolare Mengen an Eisen und Kohlenmonoxid freigesetzt werden (Abb. 2). Biliverdin wird anschließend sehr schnell mittels Biliverdinreduktase in das wasserunlösliche Bilirubin reduziert [55] , reversibel an Albumin gebunden und über die Galle ausgeschieden. Freies Eisen ist in der Lage, die Bildung von Sauerstoffradikale in der Zelle zu katalysieren [56] . Somit wirken hohe Konzentrationen von freiem Eisen zytotoxisch. Um dem entgegenzuwirken wird es sofort nach seiner Freisetzung durch die Synthese von Ferritin gebunden und gespeichert [57] .

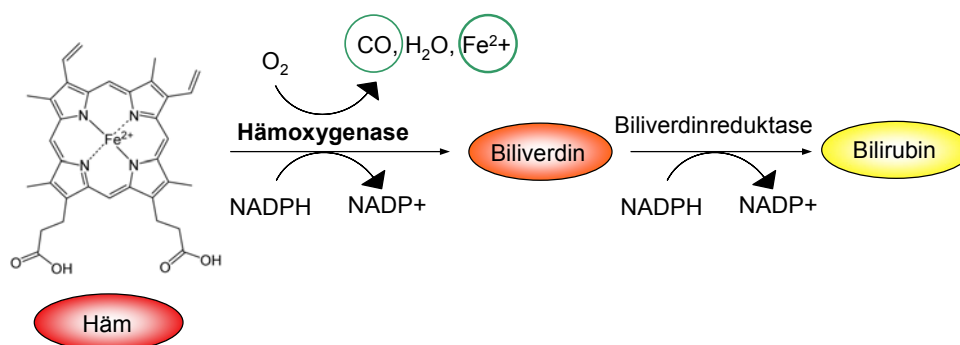


Abb. 2 Hämprotein-Abbau durch Hämoxygenase katalysiert

1.4.1 Die immunmodulatorischen Eigenschaften von Hämoxxygenase-1

Die immunmodulatorischen Wirkungen von HO-1 werden oft den Abbauprodukten der Reaktion, insbesondere Biliverdin/Bilirubin und Kohlenmonoxid, zugeschrieben. Biliverdin zeichnet sich durch eine inhibierende Wirkung auf das humane Komplementsystems aus [58]. Bilirubin werden antiinflammatorische Eigenschaften, wie die Inhibition des Komplementsystems [58] und der Interleukin (IL)-2-Synthese [59,60] zugeschrieben. Zudem wurde gezeigt, dass Bilirubin zu einem Schutz neuronaler Zellen vor Apoptose führt [61]. Kohlenmonoxid (CO) inhibiert die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β und regt gleichzeitig die Produktion des antiinflammatorischen IL-10 an [62]. Zudem ist CO an der Inhibition der T-Zell-Proliferation beteiligt, indem es die Expression und Aktivierung von Caspase 3 und 8 supprimiert [63]. Des Weiteren ist CO durch Induktion einer Vasodilation an der Regulation des Blutdrucks beteiligt [64].

Auch viele Tiermodell-Studien postulieren eine antiinflammatorische Wirkung von HO-1. So zeigt ein Mausmodell eine zytoprotektive Wirkung von HO-1 in der akuten, durch D-Galaktosamin und LPS ausgelösten Leberentzündung. D-Galaktosamin (GalN) führt zu einer Akkumulation von UDP (Uridine-Diphosphat)-Galaktosamin-Derivaten in der Leber, so wodurch Transkription und Translation gehemmt werden [65]. In Folge dessen kommt es zu einer Sensibilisierung des Lebergewebes für die toxische Wirkung von LPS, so dass die Gabe einer eigentlich subtoxische Menge Endotoxin eine akute Hepatitis auslöst [66]. Die behandelten Mäuse entwickelten schwere, von TNF- α und IFN- γ abhängige Leberschädigungen. Eine HO-1 Hochregulation schützte diese Mäuse auf Grund einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine vor einer GalN/LPS induzierten Leberschädigung. Ein vergleichender Versuch zeigt, dass die protektive Wirkung hauptsächlich von den beiden HO-1 Produkten CO und Biliverdin abhängt, da nur bei gleichzeitiger Gabe beider Produkte eine Entzündungshemmung zu beobachten war [67]. Anti-inflammatorische, zell-protektive Effekte der HO-1 wurden auch in einem Kaninchen-Modell gezeigt, in dem koronare Endothelzellen durch Überexpression von HO-1 vor einer Hämoglobin-induzierten Entzündungsreaktion geschützt wurden [68]. Auf eine entzündungshemmende, zytoprotektive Wirkung von HO-1 weisen auch zahlreiche Organtransplantationsmodelle. Eine einmalige Vorbehandlung des Spenderorgans mit Cobalt-Protoporphyrin (CoPP), durch die es zu einer Überexpression von HO-1 kommt, schützt das Transplantat gegen Ischämie/Reperfusionsschäden [43,44,45,69]. Des Weiteren konnte in einem Schlaganfallmodell der Maus eine protektive HO-1-Wirkung gezeigt werden. Transgene Mäuse, welche HO-1 unter Kontrolle des neurospezifischen Promotors Enolase überexpremieren, zeigten nach Hochregulation von HO-1 eine verminderte Ausbreitung des experimentell ausgelösten Infarkts im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Die Überexpression von HO-1 korrelierte u.a. mit einer Hemmung der p38-MAPK und einem Anstieg der Ferritin-Synthese [70].

Ein Zusammenhang zwischen induzierter HO-1 Hochregulation und verminderter MHC-II Expression postuliert ein Mausmodell der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), ein Modell für Multiple Sklerose (MS). Dabei wird durch Immunisierung mit Proteolipid-Protein (PLP) eine Autoimmunreaktion ausgelöst, durch die es zu einer entzündungsbedingten Demyelinisierung der Myelinscheide der Axone kommt. Eine CoPP-induzierte Hochregulation von HO-1 kann deutlich den Verlauf der EAE abschwächen, indem durch Suppression der MHC-II-Expression die Reaktivierung autoimmuner T-Zellen gehemmt wird [71]. Auch in murinen Endothelzellen hemmt HO-1 die IFN- γ -induzierte Hochregulation MHC-II Expression. Dieser hemmende Effekt war von dem HO-1 Produkt Bilirubin abhängig, wohingegen weder CO noch freies Eisen die MHC-II Hemmung vermitteln konnten [72].

Eigene Vorarbeiten während meiner Diplomarbeit zeigten zudem, dass eine Hochregulation der HO-1 Expression in humanen Monozyten, Makrophagen und MDDC (monocyte derived dendritic cell) zu einer Hemmung der LPS-induzierten Expression von HLA-DR und den Co-Molekülen CD86 und CD40 führt [48,73]. Dieser veränderte Phänotyp resultierte in einer verminderten, antigenabhängigen T-Zell-Aktivierung, während die direkte, mitogenabhängige T-Zell-Aktivierung unbeeinflusst blieb.

1.4.2 Die Induktion von Hämoxxygenase-1

HO-1 ist die einzige der drei Isoformen, deren Expression induziert werden kann. Wie bei allen Hitzeschockproteinen wird die Synthese von HO-1 durch oxidativen Stress (z.B. Hitzeschock, UV-Strahlungen) angeregt. Auch Entzündungsmediatoren wie IL-6 sind in der Lage die Expression von HO-1 zu induzieren [74]. Zudem wird HO-1 sehr stark durch sein eigenes Substrat, dem Hämprotein, induziert [75]. Weitere Mediatoren, welche eine Aktivierung des HO-1 Gens beeinflussen, sind synthetische Metallprotoporphyrine. Dabei entscheidet das zentrale Metallion über eine inhibitorische oder induzierende Wirkung des Protoporphyrins. Protoporphyrine mit Zinn²⁺ (SnPP), Zink²⁺ (ZnPP), Chrom (CrPP) oder Mangan²⁺ (MnPP) als Zentralion wirken als kompetitive Inhibitoren der Hämoxxygenase. Cobalt (CoPP) führt hingegen zu einer quantitativen und qualitativen Hochregulation der HO-1 Expression [76]. Während CoPP reversibel an das Enzym bindet, ist die Bindung von SnPP, ZnPP [77], CrPP und MnPP irreversibel, so dass trotz erhöhter HO-1 Expression die katalytische Funktion des Enzyms gehemmt wird.

Durch die reversible Bindung von CoPP an HO-1 wird zunächst die Funktion von HO-1 gehemmt und es kommt zu einer Anregung der Neusynthese von HO-1. Durch Entfernen des Protoporphyrins kann die Hemmwirkung wieder aufgehoben werden und man erhält eine Hochregulation funktionell wirksamer HO-1. Der genaue Mechanismus dieser HO-1 Induktion ist jedoch bis heute ungeklärt [78], dennoch wird CoPP in zahlreichen Tiermodellen erfolgreich als potenter Induktor von HO-1 eingesetzt.

1.5 CD163 - der Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor

Die zur HO-1 Induktion verwendeten Protoporphyrine CoPP und Hämin sind dem körpereigenen HO-1 Substrat (Häm) strukturell sehr ähnlich. Sie bestehen aus vier Porphyrinringen mit einem zentralen Metallion. CoPP besitzt als Zentralion ein Cobaltion. Hämin und Hämprotein besitzen beide ein Eisenion, wobei ausschließlich das zweiwertige Eisenion des Hämproteins in der Lage ist Sauerstoff zu binden (Abb3).

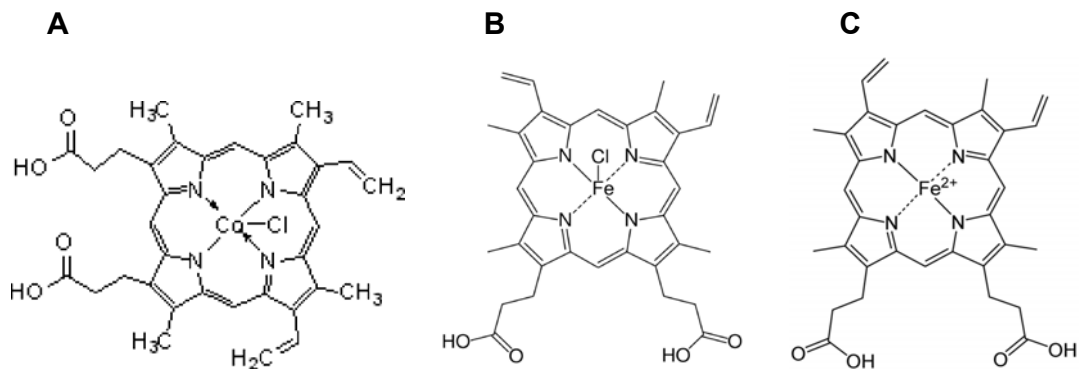


Abb. 3 Strukturformel von CoPP (A), Hämin (B) und Hämproteins (C)

(A) Cobalt-Protoporphyrin, Abb. nach Sigma Aldrich; (B) Hämin, Abb. nach Wikipedia; (C) Hämprotein, Abb. nach Wikipedia.

Das für den Sauerstofftransport in Erythrozyten und den Gasaustausch ($\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{O}_2$) an den Lungenalveolen essentielle Hämoglobin besteht aus vier Hämproteinen, welche jeweils an ein Polypeptid, das Globin, gebunden sind. Extrazelluläres Hämoglobin (Hb) kann durch Autooxidation in HbFe^{3+} und O_2^- (Hyperoxid) degradiert werden. Die sehr reaktiven Hyperoxide haben eine cytotoxische Wirkung [79] und werden den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygene species) zugeordnet. Um dem entgegen zu wirken wird Hb nach Freisetzung sofort durch den Hämoglobin-Scavenger Rezeptor (CD163) in die Zelle aufgenommen [80] und mit Hilfe von HO-1 zu Carbonmonoxid (CO), Bilirubin und freiem Eisen degradiert. Bei hohen extrazellulären Hämoglobinkonzentrationen kann das Molekül direkt an den Rezeptor binden, für eine optimale Aufnahme ist jedoch die Komplexbildung (Hb/Hg) mit dem Plasmaprotein Haptoglobin (Hg) notwendig (Abb. 4). Das in der Leber produzierte Dimer bindet mit hoher Affinität irreversibel an Hämoglobin. Es kann somit freies Hämprotein effektiv „einfangen“ und zu den CD163 exprimierenden Zellen transportieren. CD163 gehört zur Familie der SRCR (scavenger receptor cystein rich)-Rezeptor, welche wiederum zu den PRRs gehören. Die SRCR-Rezeptoren sind auf Grund der Anzahl ihrer Disulfidbrücken in zwei Gruppen unterteilt, wobei CD163 zur Gruppe B mit drei Disulfidbrücken gehört [81]. Der Komplex aus Hämoglobin und Haptoglobin

(HbHg) interagiert mit der SRCR Domäne 3 des Rezeptors, wodurch die Aufnahme in die Zellen mittels Endozytose initiiert wird [82] .

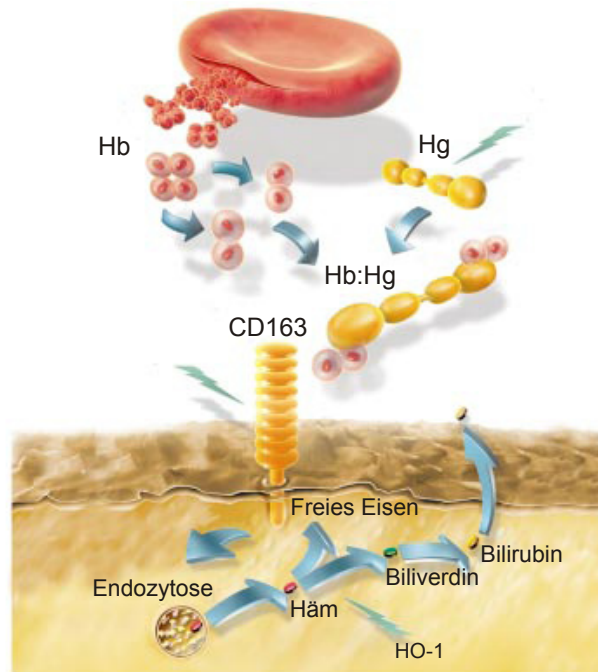


Abb. 4 Aufnahme von freiem Hämoglobin über den Hämoglobin-Scavenger Rezeptor CD163

Modifizierte Abbildung nach C. Dennis [83] .

Der Hämoglobin-Scavenger Rezeptor wird hauptsächlich auf Monozyten sowie Makrophagen in Leber und Milz exprimiert, aber auch von aktivierten, differenzierten Dendritischen Zellen [79] . Zudem ist beschrieben, dass frisch isolierte Monozyten zeitabhängig ihre CD163 Expression *ex vivo* hochregulieren, wobei nach 3 Tagen in Kultur das Maximum erreicht ist [84] . Die Expression von CD163 kann durch antiinflammatorische Stimuli wie IL-10 oder Glukokortikoide induziert werden [85,86] . Zugleich ist beschrieben, dass die Interaktion von HbHg mit CD163 die Sekretion von IL-10 stimuliert [87] .

1.6 Die Regulation der MHC-II Expression

Der Genlokus (HLA-Gene, Human Leucocyte Antigen) von MHC-II-Molekülen liegt auf dem Chromosom 6 und umfasst ca. 7×10^6 Bp. Die MHC-II Gene kodieren die polymorphen HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ Proteine, welche als $\alpha\beta$ -Dimer (Übersicht 2) auf der Zelloberfläche von APCs lokalisiert sind. Bis heute sind über 400 verschiedene MHC-Allele bekannt, so dass die

meisten Individuen heterozygot in ihrem MHC-Lokus sind. Durch die kodominante Expression beider Allele lassen sich auf den APCs Produkte beider Genvarianten finden. Dies gewährleistet eine sehr große Diversität der MHC-II Moleküle, wodurch eine Vielzahl von Antigenen gebunden und präsentiert werden können [10] .

Da die Präsentation von Pathogenbestandteilen eine zentrale Rolle in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort spielt, ist eine genaue Regulation der MHC-II Expression von besonderer Bedeutung. Die Transkription der MHC-II Moleküle steht unter der Kontrolle des Klasse-II-Transaktivators (CIITA) und ist von der Interaktion zahlreicher Cofaktoren, wie CREB (cAMP response element-binding protein) und RFX (regulatory factor X) abhängig. CIITA spielt bei der Regulation der MHC-II Expression eine zentrale Rolle, da sowohl die induzierte als auch die konstitutive HLA-DR Expression durch den Masterregulator reguliert ist. Im Gegensatz zu vielen Transkriptionsfaktoren ist CIITA jedoch kein DNA-bindendes Molekül. Vielmehr koordiniert CIITA die korrekte Anordnung der notwendigen Transkriptionsfaktoren und deren Bindung an den MHC-II-Promotor. Der Komplex aus CIITA und den Transkriptionsfaktoren wird als MHC-Enhanceosome-Komplex bezeichnet und interagiert mit W/S-Box, X-Box und Y-Element im MHC-II Promoter (Abb. 5).

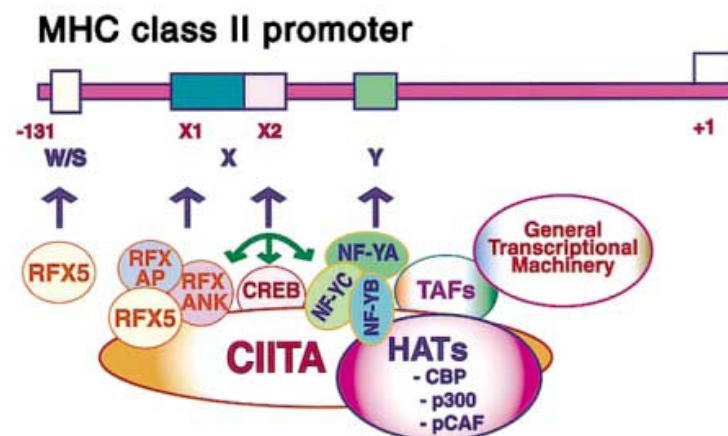


Abb. 5 Interaktion zwischen CIITA, seinen Cofaktoren und der Promotorregion von MHCII

Schematische Abbildung nach Ting et al. [88] . CIITA und die Cofaktoren bilden den MHC-II Enhanceosome Komplex, welcher mit dem Promotorbereich des MHC-II Gens wechselwirkt. Dabei interagiert RFX5 (regulatory factor X) mit der W/S-Box, die RFX-Molekülen und CREB interagieren mit der X-Box und NF-Y, ein Komplex aus NF-YA, NF-YC und NF-YB (NF= nuclear transcription factor) interagiert mit dem Y-Element.

Die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren werden weitestgehend ubiquitär exprimiert, so dass die Regulation der MHC-II-Expression hauptsächlich von der Regulation der CIITA-Expression

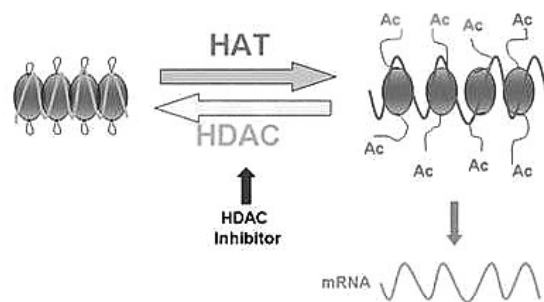
abhängt. Auf Grund seiner zentralen Bedeutung für die Koordination der HLA-DR-Expression unterliegt er selbst einer komplexen transkriptionellen Regulation. So wird die CIITA-Expression in den verschiedenen Zelltypen von vier voneinander unabhängigen Promotorregionen gesteuert. Die vier Splicevarianten sind funktionell identisch, unterscheiden sich jedoch in ihrer Größe (pI=121kDa, pIII=124kDa, pIV=132kDa), wobei die Abweichungen ausschließlich im N-Terminus (Exon 1) des Proteins zu finden sind. Die Aktivität der verschiedenen Promotorregionen und somit das Vorkommen der verschiedenen Splicevarianten ist zelltypabhängig. Während die Spezifität von pII bis heute unbekannt ist, ist pI hauptsächlich in myeloiden Zellen (Monozyten, Makrophagen, DC) aktiv. pIII gilt als Hauptpromotor der CIITA Expression in lymphoiden Zellen wie B-Zellen und pIV ist hauptsächlich für die IFN- γ induzierte CIITA-Expression verantwortlich. Die Zellspezifität der verschiedenen Promotoren wird jedoch kontrovers diskutiert. [89,90,91]

Als negative Regulatoren der MHC-II-Expression gelten die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β [35,92] , welche bei der Begrenzung der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen. Insbesondere die MHC-II-hemmende Wirkung von IL-10 ist gut beschrieben [93,94] . Das Zytokin beeinflusst die Exozytose und das Recycling der MHC-II-Moleküle [95] , wodurch die HLA-DR-Expression vermindert und die antigen-spezifischen T-Zellantwort supprimiert wird [96] .

1.6.1 MHC-II Genregulation durch Histonacetylierung

Die grundlegende Voraussetzung für eine optimale Gentranskription ist die Zugänglichkeit der Transkriptions-maschinerie an die Promotorregion des zu transkribierenden Gens. Die DNA-Doppelhelix, bestehend aus zwei gegenläufigen Einzelsträngen (komplementäre Basenpaarung), ist um kleine Proteinkomplexe gewickelt. Diese Proteinkomplexe bestehen aus vier paarig angeordneten Histonen und bilden zusammen mit der DNA ein Nukleosom. Daraus ergibt sich eine „Perlenketten“-ähnliche Struktur, die wiederum in sich verdrillt und nach einer weiteren Verdrillung (Supertwist) schleifenartig im Chromosom angeordnet ist [97] . Im ruhenden Zustand ist die DNA in einer sehr festen, eng gepackten Struktur organisiert. Durch Modifikationen der Proteinkomplexe (z.B. Histonacetylierungen) kann es zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur kommen, so dass die an der Transkription beteiligten Proteine (Polymerasen, Transkriptionsfaktoren, etc), mit der Promotorregion des entsprechenden Gens interagieren und die Transkription initiieren können.

Histone Acetylation/Deacetylation



<http://oncotalk.com/2007/07/16/vorinostatsaha-in-lung-cancer/>

Abb. 6 Schema der Histonmodifikation durch Acetylierung

Die, zur Transkription benötigte, Acetylierung von Histonen wird durch Histoneacetyltransferasen (HAT) induziert, welche Acetylgruppen an die Lysinreste des N-terminalen Endes von Proteinen übertragen können [98]. Rekrutiert werden die HATs oft von Proteinen und Cofaktoren, welche für die Transkription essentiell sind. So auch im Fall des MHC-II Masterregulators CIITA, welcher die HATs CBP (cAMP responsive-element binding protein)/p300 und pCAF (p300/CBP-associated factor) rekrutiert [99]. CIITA interagiert jedoch auch mit Histondeacetylasen (HDAC) [100], welche für die Umkehrung der Genaktivierung eine wichtige Rolle spielen. HDAC sind für die Deacetylierung der Histone verantwortlich und entfernen die Acetylgruppe von den Proteinkomplexen, so dass die Nukleosomen wieder enger „gepackt“ werden. Durch die Interaktion von CIITA und HDAC wird die Trennung von CIITA und den Cofaktoren NFY und RFX induziert, wodurch diese ihren Einfluss auf die MHC-II Expression verlieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Histondeacetylierung mittels HDAC1 die IFN- γ -induzierte MHC-II-Expression in 5367-Zellene (eine humane Carcinoma-Zelllinie aus der Harnblase) vermindern kann [100]. Ähnliches konnte in HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney cells) und in den monozytären THP-1 Zellen (Human acute monocytic leukemia cell line) gezeigt werden. Durch Interaktion von HDAC2 mit CIITA wurde die Aktivität des Masterregulators herabgesetzt, was in einer verminderten MHC-II Expression resultierte [101].

1.6.2 MHC-II Genregulation durch PKA-Aktivierung

Proteinkinase A (PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase) ist ein Heterodimer, bestehend aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten. Die regulatorischen Untereinheiten blockieren die katalytischen Zentren, so dass der R_2C_2 -Komplex inaktiv ist. Die beiden regulatorischen Untereinheiten binden jedoch mit hoher Affinität jeweils ein cAMP-Molekül (cyclisches Adenosinmonophosphat), wodurch die Dissoziation des R_2C_2 -Komplexes initiiert wird und die katalytisch aktiven Untereinheiten freigesetzt werden. Die Aktivität von PKA wird demnach maßgeblich von der intrazellulären cAMP-Konzentration beeinflusst.

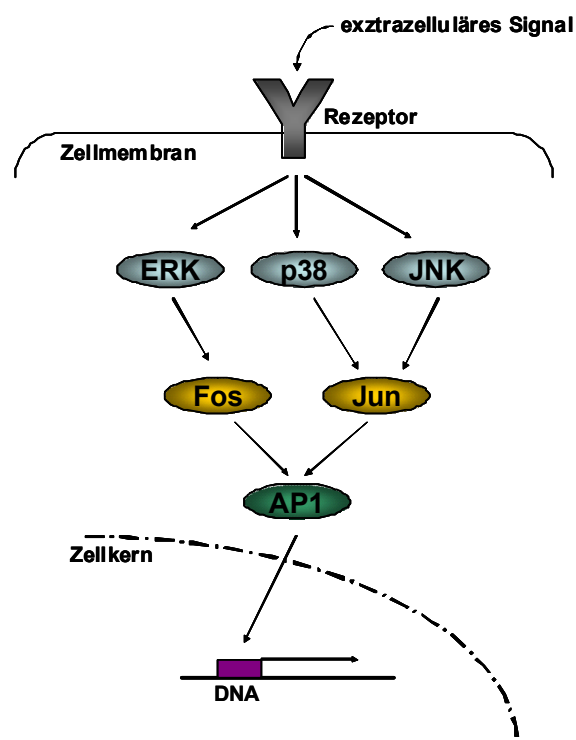


Abb. 7 Schema der AP-1 Aktivierung durch MAPK Signalwege

In der Literatur wird eine Beteiligung von PKA an der MHC-II Expression beschrieben. In einer Studie mit isolierten Makrophagen aus der Maus wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Gabe von 8-Bromo cAMP (8-Br cAMP, ein cAMP-Analog, welches nicht enzymatisch abgebaut wird) oder Behandlung mit Prostaglandin E2 (PGE2) die IFN- γ -induzierte MHC-II Expression hemmt [102]. PGE steigert die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Aktivierung der Adenylatcyclase, welche die Umwandlung von ATP (Adenosintriphosphat) zu cAMP katalysiert. Auch die Behandlung von murinen und humanen Monozytenzelllinien mit 8-Br cAMP und PGE resultierte in einer Hemmung der CIITA-Aktivität, wodurch es zu einer verminderten MHC-II-Expression kommt. Durch eine Punktmutation im

CIITA-Gen zeigte sich, dass für diese Hemmung eine PKA-induzierte Phosphorylierung von zwei Serinresten (Ser 834, Ser 1050) am MHC-II Masterregulator notwendig ist [103] . Gegen eine PKA-abhängige Hemmung der CIITA-Expression spricht jedoch eine Studie mit HEK 293 Zellen (Human Embryonic Kidney cells). Hier wurde postuliert, dass die PKA-induzierte Phosphorylierung von CIITA die Aktivität des MHC-II Masterregulators erhöht [104] . Diese Diskrepanz der Literaturdaten lässt sich möglicherweise mit Spezies- und Zelltyp-spezifischen Unterschieden erklären, deutet aber darauf hin, dass die PKA wahrscheinlich eine Rolle bei der MHC-II Expression spielt.

1.6.3 MHC-II Genregulation durch MAPK

Die intrazelluläre Signalweiterleitung ist von der Phosphorylierung und Dephosphorylierung der an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle abhängig. In der Regel sind intrazelluläre Signalwege mehrstufige Prozesse. So auch die Signalweiterleitung durch das Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)-System. Diese Phosphorylierungskaskade umfasst drei hintereinander geschaltete Kinasen (MAP-3K, MAP-2K, MAPK), an deren Ende die Aktivierung der MAPK steht. Diese ca. 36-44 kDa großen Proteinkinasen sind in der Lage Serin- bzw. Threoninreste anderer Proteine zu phosphorylieren und zu aktivieren. Aufgrund der beteiligten Kinasen unterscheidet man drei MAPK-Signalwege. Den ERK1/2 (extracellular signal-related kinase1/2) abhängigen Signalweg, welcher hauptsächlich an der mitogen- und wachstumsfaktorabhängigen Differenzierung und Proliferation beteiligt ist [105] , sowie den p38-mitogenaktivierte Proteinkinase-Weg und den JNK (c-Jun-terminale Kinase) abhängigen Weg [106] , welche eine wichtige Rolle bei stress-aktivierten Signalwegen (z.B durch Änderungen des osmotischen Drucks oder UV-Licht) spielen [107,108] .

MAPK-abhängige Signaltransduktionswege werden auch im Zusammenhang mit der CIITA- und HLA-DR-Expression diskutiert. In Melanoma-Zellen ist die konstitutive HLA-DR-Expression von der Aktivität der MAPK/ERK Kinase (MEK) 1 und von JNK abhängig, da eine Hemmung der beiden MAPK zu einer verminderten HLA-DR-Expression führte. Es konnte gezeigt werden, dass die konstitutive HLA-DR Expression in den Melanomazellen von einer Aktivator-Protein-1- (AP-1) Bindestelle im Promotor III (pIII) des CIITA abhängt [109] . Der Transkriptionsfaktor AP-1 wird durch MAPK-Signalwege induziert und setzt sich aus den Molekülen Fos und Jun zusammen. Die Aktivität von Fos wird hauptsächlich durch den ERK-Signalweg induziert, kann aber auch durch die p38 und JNK induziert werden. Jun wird dagegen hauptsächlich durch den p38 und JNK Signalweg induziert (Abb. 7) [110] .

MAPK spielen eine wichtige Rolle bei der Reifung von humanen DCs. Es zeigte sich, dass eine Aktivierung von p38 für die LPS-induzierte Reifung von MDDC (monocyte derived dendritic cell) von großer Bedeutung ist. Eine Hemmung von p38 resultierte in einer verminderten LPS-

induzierten Expression von HLA-DR- und MHC-II-costimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 [111]. Jedoch scheinen die verschiedenen MAPK-Wege unterschiedliche Einflüsse auf die MHC-II-Expression zu haben. Eine Hemmung von JNK führt, im Gegensatz zu p38, zu einer leichten Steigerung der LPS-induzierten HLA-DR-Expression, während die Expression der Comoleküle CD80 und CD86 durch eine JNK-Hemmung inhibiert wurde [112].

1.7 Synthese und Beladung von MHC-II Molekülen

Das neu synthetisierte MHC-II-Molekül ist zunächst im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Flankiert wird das unbeladene Molekül von CD74, der „invariant chain“, welche durch Blockierung der Peptid-Bindetasche des MHC-II Moleküls die Bindung körpereigener Proteine verhindert. Zusätzlich stabilisiert ein flankierendes HLA-DM-Molekül den Komplex aus MHC-II und CD74. Dieser dreiteilige Komplex wird in Vesikeln Richtung Zelloberfläche transportiert, wo er unterwegs mit Lysosomen verschmilzt. Diese enthalten die phagozytierten Fremdproteine, die mittels MHC-II auf der Oberfläche präsentiert werden. Durch die Verschmelzung beider Vesikel kommt es zu einer Ansäuerung des MHC-II-enthaltenden Vesikels und die zu präsentierenden Antigene binden an das MHC-II-Molekül. Die Ansäuerung ist von besonderer Bedeutung für die Beladung des MHC-II-Moleküls, da die invariant chain mit Hilfe von lysosomalen Proteasen (Cathepsine) nach und nach abgebaut wird, so dass nur noch ein kleines Peptid, das sogenannte CLIP-Protein, in der Bindetasche übrig bleibt. Zudem kann nur im sauren Milieu HLA-DM den Austausch von CLIP gegen das prozessierte und zu präsentierende Antigen katalysieren. Durch Verschmelzung der Vesikel mit der Zelloberfläche werden die beladenen MHC-II-Moleküle dann den CD4-T-Zellen präsentiert (Abb. 8). [113,114,115]

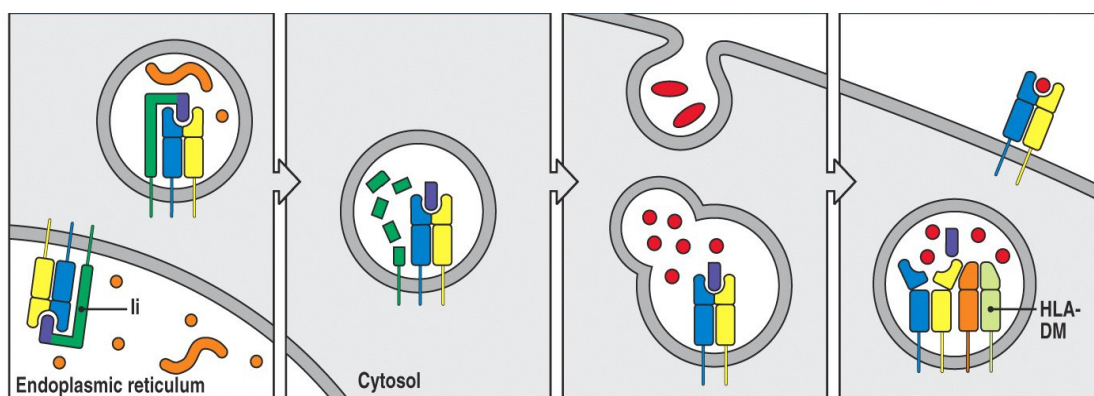


Figure 5-10 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abb. 8 Antigenbeladung des MHC-II Moleküls im Golgie Apparat

Schematische Darstellung der MHC-II Beladung mit extrazellulärem Antigen [10]

2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Viele Studien deuten auf eine antiinflammatorische und zytoprotektive Wirkung von HO-1 hin. Als Hitzeschockprotein wird HO-1 durch verschiedene Stressmediatoren wie Hitze, UV-Licht, aber auch oxidativen und immunologischen Stress induziert, so dass sie dann als negativer Regulator einer Entzündung agieren kann. Eine Studie in Patienten nach Herz-Operation zeigte, dass eine frühe Hochregulation von HO-1 mit einer langanhaltenden Immundepression und einem vermehrten Auftreten infektiöser Komplikationen assoziiert ist. Unter der Annahme, dass HO-1 als Mediator einer langanhaltenden Immundepression agieren kann, formulierten wir folgende Hypothese:

- ⇒ Eine HO-1 Hochregulation führt zu phänotypischen Veränderungen in APCs, einschließlich einer verminderten MHC-II-Expression, wie sie auch im Rahmen einer in der Klinik zu beobachtenden Immundepression auftritt.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Welchen Effekt hat eine Induktion von HO-1 auf den Phänotyp von humanen Monozyten?
 - Beeinflussung der MHC-II Expression und MHC-II regulierender Gene (HLA-DR, CD74, HLA-DM)
 - Zell- und MHC-Spezifität der Effekte (Vergleich zu MHC-I Expression auf Monozyten und MHC-II Expression auf B-Zellen,)
2. Ist der beobachtete Effekt HO-1 spezifisch?
 - Vergleich synthetischer (Cobalt-Protoporphyrin) und physiologischer (Hämin) HO-1 Induktoren.
 - Lassen sich die Effekte durch Hemmung von HO-1 aufheben, oder sind andere, HO-1 unabhängige Mechanismen verantwortlich?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zellkultur und Stimulation

3.1.1.1 Medien, Lösungen und Reagenzien

<u>Name</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Firma</u>
FCS (fetal bovine serum)		Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin Stocklsg.: 200mM	Biochrome AG, Berlin
Penicilin/Streptomycin	Stocklsg.: 10000µg/ml	Biochrom AG, Berlin
Kulturmedium	RPMI 1640 10% hitzeinaktiviertes FCS (bovine serum albumin) 1% L-Glutamin 1% Penicilin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's PBS		PAA, Cölbe
Biocoll Separation Solution	Dichte: 1,077g/ml	Biochrome AG, Berlin

3.1.1.2 Stimulantien und Inhibitoren

<u>Name</u>		<u>Firma</u>	<u>Stockkonzentration</u>
RP-8-Br-cAMP	cAMP-Isomer	Alexis Biochemicals, USA	50mM
RP-8-Br-cGMP	cGMP-Isomer	Alexis Biochemicals, USA	50mM
CMV	Cytomegalie-Viruslysät	ABI, Columbia, USA	
	IE-1 Peptidgemisch	JPT Peptid Technologie GmbH, Berlin	1µg/ml pro Einzelpeptid
	pp65-Peptidgemisch	JPT Peptid Technologie GmbH, Berlin	1µg/ml pro Einzelpeptid
ConA	Concanavalin A	Sigma-Aldrich GmbH, München	1mg/ml
CoPP	Cobalt-Protoporphyrin	Frontier Scientific, Carnforth, UK	2mM
Gö6850	PKC-Inhibitor	Axxora GmbH, Lörrach	4,8mM
Hämin		Sigma Aldrich GmbH (Fluka), München	20mM
Hämoglobin		R&D Systems, Wiesbaden	20mg/ml
Haptoglobin		R&D Systems, Wiesbaden	10mg/ml
IFN-γ	Interferon gamma	Immukin®, Boehringer Ingelheim	200µg/ml

LPS	Lipopolysaccharid	Stamm: E.coli 0127:B8 Sigma Aldrich GmbH, München	1mg/ml
SB205580	p38-Inhibitor	Axxora GmbH, Lörrach	1mg/ml
SP600125	JNK-Inhibitor	Axxora GmbH, Lörrach	5mM
TSA	Trichostatin A	Sigma Aldrich GmbH, München	
Wortmannin	PI3K-Inhibitor	Axxora GmbH, Lörrach	2mM

3.1.2 Zellseparation

3.1.2.1 MACS

<u>Name</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Firma</u>
MACS-Puffer	PBS 2mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid; Stock: 0,5M) 2% FCS	PAA, Cölbe Sigma Aldrich GmbH, München Biochrom AG, Berlin
CD14 human beads		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
LS-Säulen		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

3.1.2.2 Rosette Sep

<u>Name</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Firma</u>
RosetteSep-Puffer	PBS 1mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid; Stock: 0,5M) 2% FCS	PAA, Cölbe Sigma Aldrich GmbH, München Biochrom AG, Berlin
RosetteSepMonocyte enrichment kit		Stem Cell Technologies Inc

3.1.3 Durchflusszytometrie

3.1.3.1 Puffer

Name	Zusammensetzung	Firma
FACS-Puffer	1000ml Falk-Lösung 20ml FCS 1g Natrium-Azid	Charité, Virchow-Klinikum, Apotheke Biochrom AG, Berlin Sigma Aldrich GmbH, München
BD-Lysepuffer	10fach Puffer 1:10 mit bidest. H ₂ O verdünnt	BD Biosciences, Heidelberg

3.1.3.2 Antikörper

Name	Klon / Zusammensetzung	Firma
anti HIA-DR (purified)	L243 (G46-6)	BD Biosciences, Heidelberg
CD3 PerCP		BD Biosciences, Heidelberg
CD4 APC	RPA-T4	BD Biosciences, Heidelberg
CD8 Pe	SK-1	BD Biosciences, Heidelberg
CD14 APC	M5E2	BD Biosciences, Heidelberg
CD19 APC	SJ25C1	BD Biosciences, Heidelberg
CD19 PerCP Cy5.5	SJ25C1	BD Biosciences, Heidelberg
CD163 Pe	GHI/61	BD Biosciences, Heidelberg
Diff.Mix	CD2 Fitc / CD16 Fitc CD3 Pe / CD19 Pe CD45 PerCP CD14 APC	BD Biosciences, Heidelberg
HLA A2 Alexa 647	BB7.2	Serotec, UK
HLA-DR Pe	L243 (G46-6)	BD Biosciences, Heidelberg
HLA-DR PeCy5	TU36	BD Biosciences, Heidelberg
HLA-DR PerCP	L243 (G46-6)	BD Biosciences, Heidelberg
mouse IgG2a Pe	X39	BD Biosciences, Heidelberg
phospho STAT-1 Alexa 488	4a (Erkennung von pY701)	BD Phos FLOW Reagents, Heidelberg
phospho STAT-3 Pe	4/p-STAT3 (Erkennung von pY705)	BD Phos FLOW Reagents, Heidelberg

3.1.4 Transfektion (Gene knock down)

3.1.4.1 siRNA

Name		Sense-Sequenz	Stockkonzentration	Firma
HO-1 siRNA	HMOX 1 Cenix pre-designed ID 214511	CCUGAAAAGAUGUUGUGUC	100µM	Ambion, Woodward, USA
	HMOX 1 Cenix pre-designed ID 214550	GCAACAAAGUGCAAGAUUC	100µM	Ambion, Woodward, USA
negative ctrl siRNA			50µM	Ambion, Woodward, USA

3.1.4.2 Kit

Name	Firma
Human Monocyte Nucleofector ® Kit	Amaza Biosystems, Köln

3.2 Western Blot

3.2.1 Puffer

Name	Zusammensetzung
10x TBS-T	88g NaCl 2g KCL 30g Tris-Base 5ml Tween 20 - auf 1l mit dest. H ₂ O auffüllen pH 7,4
1x TBS-T	10x TBS-T 1:10 mit bidest. H ₂ O verdünnt
5%ige Milchlösung	Defeco TM Skim Milk (Firma: BD Biosciences, Heidelberg) 1x TBS-T
Extraktpuffer	1mM Tris, pH 7,4 100mM NaCl 1mM EDTA 1mM NaF 20mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1% Triton 10% Glycerol

	0,5 % Natriumdeoxycholat + 1 % Proteaseinhibitor (jeweils frisch zugeben)
Laufpuffer	25mM Tris Base 192mM Glycin 0,1% SDS
Odysse Infrared Imaging System Blocking Puffer	Firma: Li-Cor Biosciences
Ponceau S Solution	0,5% Ponceau S in 5% acetic acid (Firma: Sigma-Aldrich, München)
SDS-Probenpuffer (10ml)	2ml 0,625M Tris/HCL, pH6,8 0,2g SDS (Natriumdodecylsulfat) 5ml Glycerin 0,5ml β -Mercaptoethanol 0,1ml Bromphenolblau (1%ige Lösung in Ethanol) 2,4ml bidest. H ₂ O
Transferpuffer	25mM Tris Base 150mM Glycerin 10% Methanol

3.2.2 Antikörper

<u>Name</u>		<u>Firma</u>
<u>Sekundärantikörper:</u>		
Anti-Mouse (IR800) Anti-Rabbit (IR680)		Li-Cor Biotechnology, USA
ECL TM Anti-rabbit IgG	Donkey	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<u>Primärantikörper:</u>		
Anti- β Actin	Rabbit, monoclonal	Cell signaling Technology, USA
Anti-HO-1 Antikörper	Mouse, monoclonal	Biomol GmbH, Hamburg
Anti-JAK 2	Rabbit, monoclonal	Cell signaling Technology, USA
Anti-Phospho JAK2	pTyr1007/1008), Rabbit, monoclonal	Cell signaling Technology, USA
Anti-Phospho STAT-3	pSer727, mouse, monoclonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Phospho STAT-3	pTyr705, mouse, monoclonal	Cell signaling Technology, USA
Anti-STAT-3	Mouse, monoclonal	Cell signaling Technology, USA
Phospho SAPK/JNK	Thr 185, mouse	Cell signaling Technology, USA

3.2.3 Entwicklung

<u>Name</u>	<u>Firma</u>
Kodak: developer and replenisher (GBX)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Kodak: fixer and replenisher (GBX)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Hypercassette TM	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
High performance chemiluminescence film (Hyperfilm ECL)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

3.3 RNA Analyse

3.3.1 RNA-Präparation

<u>Name</u>	<u>Firma</u>
Absolutely RNA ® Miniprep. Kit	Stratagen, Kirkland, USA

3.3.2 cDNA-Präparation

<u>Name</u>	<u>Firma</u>	<u>Stocklösung</u>
M-MLV reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe	200u/µl
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe	0,1M
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe	
Oligo dT Primer	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden	
dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden	2,5µM
DNase I; RNase-free	Ambion, Woodward, USA	2u/µl
RNasin ® (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim	40u/µl

3.3.3 Konventionelle PCR

<u>Name</u>	<u>Firma</u>
Go Tag ® DNA Polymerase Kit	Promega, Mannheim

3.3.4 RT-PCR

Name				Firma
PCR Mastermix				Eurogentec, Seraing, Belgien
Primer	HPRT	forward	5'-AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G-3'	Eurogentec, Seraing, Belgien
		reverse	5'-GAC TTT GCT TTC CTT GGT CAG G-3'	
	HO-1	forward	5'-GAA GAG GCC AAG ACT GCG TTC-3'	
		reverse	5'-TGG TCC TTG GTG TCA TGG GT-3'	
	HLA-DR	forward	Primer von Dr. Robert Sabat, Klinik für Dermatologie, Molekulare Immunpathologie [Wolk et al., Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance, J Biol Chem, 278(29): p 18030-6]	
		reverse		
	HLA-DM	forward		
		reverse		
	CD86	forward		
		reverse		
	Cath.S	forward		
		reverse		
	CD74	forward		
		reverse		
	CIITA	forward		
		reverse		
Sonden	HPRT		5'-TTT CAC CAG CAA GCT TGC GAC CTT GA-3'	Eurogentec, Seraing, Belgien
	HO-1		5'-TGC TCA ACA TCC AGC TCT TTG AGG AGT TG-3'	
	HLA-DR		Sonden von Dr. Robert Sabat, Klinik für Dermatologie, Molekulare Immunpathologie	
	HLA-DM			
	CD86			
	Cath.S			
	CD74			
	CIITA			

3.4 Verwendet Geräte

<u>Name</u>		<u>Herkunft</u>
7700 Real-Time-Sequence-Detection-System	ABI PRISM™ 7700 Sequenzdetektor	Applied Biosystems, Rodgau Jügesheim
Blotting-Gerät	Semy-Dry-Blotkammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Brutschrank	CO ₂ incubator	Sango
	CO ₂ incubator	Heraeus Instruments, Langenselbold
ECL-Entwicklung	Fluor-S™ Multimager	Biorad, Hercules, USA
FACS	FACS-Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Li-Cor Entwicklung	Odysse Imaging System	Li-Cor Biotechnology, USA
Magnet (MACS)	quadro MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Olympus BX45	Olympus, Hamburg
	Olympus CK2	
	Olympus BX40	
PCR	HYBAID Thermal Reactor	MWG – Biotec, Ebersberg
Powersupplier	Power-Pac 300	Biorad, Hercules, USA
Schüttler	MTS 2 Minishaker	IKA, Staufen
SDS-Page	Gelkammer, vertikales Elektrophorese-System	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Zentrifugen	Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
	Jouan	Jouan, Femwald
	Hermle Z160M, neo lab.	neoLab, Heidelberg
	Biofuge pico	Heraeus, Langenselbold

3.5 Verbrauchsmaterialien

<u>Name</u>	<u>Herkunft</u>
LS-Säulen für MACS Separation	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Micronics	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
PCR-Gefäße	Stratagen, Kirkland, USA
10, 100, 1000µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
0,5, 1,5, 2ml Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
6-, 24-, 48-, 96-well-Platten	BD Biosciences, Heidelberg
15, 50ml Falcon	BD Biosciences, Heidelberg
5, 10, 25ml Pipetten	BD Biosciences, Heidelberg

3.6 Die verwendeten Porphyrine

Porphyrine bestehen aus vier Porphyrinringen mit unterschiedlichen Metallen als Zentralion. Die Wirkung der jeweiligen Porphyrine hängt, wie in Kapitel 1.4.2 bereits erläutert, maßgeblich von seinem Zentralion ab.

Zur Induktion der HO-1 Expression wurde hauptsächlich das synthetisch hergestellte Cobalt-Protoporphyrin IX (CoPP) verwendet. CoPP wird als sehr potenter HO-1 Induktor beschrieben und kommt in zahlreichen Tiermodellstudien zum Einsatz. Neben CoPP wurde zudem das Porphyrin Hämin verwendet (verdünnt im verwendeten Medium (RPMI komplett)).

In der Klinik wird Hämin bei der Behandlung von akuten Porphyrie-Schüben verwendet. Porphyrie ist eine erbliche Stoffwechselkrankheit, bei der die Synthese von Hämprotein gestört ist und es zu einer Anreicherung von verschiedenen Vorstufen kommen kann. Durch den Einsatz von Hämin kommt es zu einer Feedback-Reaktion bei der die Neusynthese von Hämproteinen gehemmt wird.

3.7 Die verwendeten Stimulantien

Tab. 1 Funktion der verwendeten Stimulantien

<u>Name</u>	<u>Wirkung</u>
ConA	Concanavalin A ist ein polyclonales Mitogen und wirkt als direkter Aktivator von T-Zellen. Diese T-Zell-Rezeptor-unabhängige Aktivierung läuft über eine, ConA-induzierte Vernetzung der CD2-Moleküle auf den T-Zellen. Das, für die Interaktion zwischen T-Zelle und APC wichtige, Adhäsionsmolekül CD2 (LFA-2, Leukocyte functional antigen-2) ist auf unreifen und reifen T-

Zellen lokalisiert und dient als Rezeptor für CD58 (LFA-3, exprimiert auf APCs, Gewebezellen, Leukozyten, Epithelzellen, u.a.).

ConA lagert sich im neutralen pH-Bereich zu einem Tetramer zusammen, wodurch die Vernetzung von CD2 begünstigt wird. Im sauren pH-Bereich zerfällt es zu einem Dimer.

Cytomegalie-Virus (CMV),
IE1 Peptidmix,
pp65 Peptidmix

Das Cytomegalievirus (CMV) gehört zu der Familie der Herpesviren und ist nach erstmaliger Infektion in Monozyten/Makrophagen persistierend. Die Durchseuchungsrate ist mit 10-50% in den Industrieländern relativ hoch, wobei eine Infektion im Erwachsenenalter in den meisten Fällen ohne eine auffällige Klinik abläuft.

CMV ist ein sehr potenter Aktivator von T-Zellen, wobei hauptsächlich Viruslysate und virale Proteine, wie pp65 oder IE1, verwendet werden. CMV-Lysat besteht aus viralen Proteinfragmenten, welche zur Präsentation von APCs aufgenommen, prozessiert und mittels MHC-II-Molekülen den CD4-T-Zellen präsentiert werden. Die viralen Peptid-Mixe von pp65 (Phosphoprotein der Virusmatrix) und IE1 (Immediate early protein, essentiell für die virale Vermehrung) bestehen aus überlappenden, 15 Aminosäure-langen Sequenzfragmenten der einzelnen Peptide und können direkt auf zelloberflächliche MHC-I- und MHC-II-Moleküle geladen werden. Mittels der Peptidmixe werden demnach sowohl CD4-T-Zellen als auch CD8-T-Zellen aktiviert.

Interferon γ

Das in aktiver Form als Heterodimer vorliegende Interferon gamma (IFN- γ) wird von aktivierten cytotoxischen T-Zellen, TH1-Zellen und NK- (natürliche Killer-) Zellen produziert. IFN- γ ist ein aus 146 Aminosäuren bestehendes Glycoprotein. Es zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und spielt u.a. bei der Aktivierung von Makrophagen und der Stimulation der MHC-II Produktion eine wichtige Rolle.

Der auf vielen Zellen (u.a. Monozyten, T-Zellen) vorkommende IFN- γ -Rezeptor (IFN- γ -R) besteht aus zwei Untereinheiten und gehört zur Klasse-II-Zytokin-Rezeptor-Familie. Während die IFN- γ -R α -Ketten extrazellulär mit IFN- γ interagieren, sind die IFN- γ -R β -Ketten für die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade notwendig. Durch Ligandbindung wird die Dimerisierung von zwei IFN- γ -R α - mit zwei IFN- γ -R β -Ketten induziert. Dies stimuliert die Autophosphorylierung von zwei rezeptorassoziierten Janus-Kinasen (JAK 1/2), wodurch die intrazelluläre Signalkaskade induziert wird. In deren Verlauf kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors

STAT-1 (Signal transducer and activator of transcription). Dieser bildet nach Phosphorylierung ein Homodimer, wandert in den Kern und induziert dort u.a. die Expression von CIITA. Eine gesteigerte CIITA-Expression führt dann zu einer Induktion der MHC-II-Expression [116,117] .

Lipopolysaccharid (LPS)	Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und besteht aus drei Untereinheiten: dem in der Bakterienmembran verankerten Lipid A, dem nach außen ragenden Polysaccharid und einer Kernregion. Durch Lyse des Bakteriums kommt es zur LPS-Freisetzung. LPS ist ein sehr potenter Aktivator für Monozyten und Makrophagen, wobei die endotoxische Wirkung hauptsächlich dem Lipid A zugeschrieben wird. LPS wird von dem im Plasma vorkommenden LPS-Bindeprotein (LBP), einem Akute-Phase-Protein, gebunden. Dieser Komplex kann dann von CD14, ein Oberflächenrezeptor von Monozyten und Makrophagen, erkannt werden. Durch Interaktion des CD14:LPS/LBP-Komplexes mit dem, ebenfalls auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen vorkommenden, Toll-Like-Rezeptor (TLR) 4 kommt es zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade. Über die Aktivierung von NF- κ B wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine induziert
-------------------------	--

3.8 Die verwendeten Inhibitoren

Die zur Analyse der unterschiedlichen intrazellulären Signalwege verwendeten Inhibitoren werden im Folgenden kurz erläutert.

Tab. 2 Die verwendeten Inhibitoren und ihre Funktion

<u>Name</u>		<u>Wirkung</u>
Histondeacetylase-Inhibitor	TSA	Trichostatin A (TSA) ist eine organische Verbindung mit antibiotischen Eigenschaften, welche selektiv und reversibel HDACs (Histondeacetylasen) der Klasse I und II hemmt. TSA verhindert dadurch die Deacetylierung von Histonen und wirkt somit der Stilllegung der Genexpression entgegen.
p38-Inhibitor	SB203580	SB203580 ist ein zellpermeabler, sehr spezifischer Inhibitor von p38 Mitogen-aktivierter Proteinkinase.

		Er hemmt kompetitiv die Bindung von cAMP an p38 und verhindert so dessen Aktivierung.
JNK-Inhibitor	SP600125	SP600125 ist ein ATP-kompetitiver, selektiver Inhibitor von JNK-1, -2 und -3. Zudem hemmt es dosisabhängig die Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IFN- γ .
PKA-Signalweg-Inhibitor	cAMP Antagonist	Rp-8-Br-cAMP bindet kompetitiv mit cAMP an die regulatorische Untereinheit von PKA und hemmt somit die cAMP-abhängige Aktivierung von Proteinkinase A.
STAT-3-Inhibitor	JSI 124	Cucurbitacin I (JSI 124) ist ein selektiver Inhibitor des JAK/STAT3 Signalweges. JSI 124 hemmt die Phosphorylierung von STAT-3 und verhindert somit die zur Aktivierung notwendige Dimerisierung. JSI 124 vermindert jedoch gleichzeitig den intrazellulären Level von Thyrosin-phosphorylierter Janus Kinase (JAK) [118] .

3.9 Methoden

3.9.1 Zellpräparation

Vollblut besteht, wie in Abb. 9 dargestellt, zu ~56% aus Plasma und zu ~44% aus den zellulären Bestandteilen. Diese setzen sich auch Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten zusammen. Während die Erythrozyten hauptsächlich für den Sauerstofftransport und die Thrombozyten die bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle spielen, sind die Leukozyten maßgeblich für die Immunabwehr von Bedeutung.

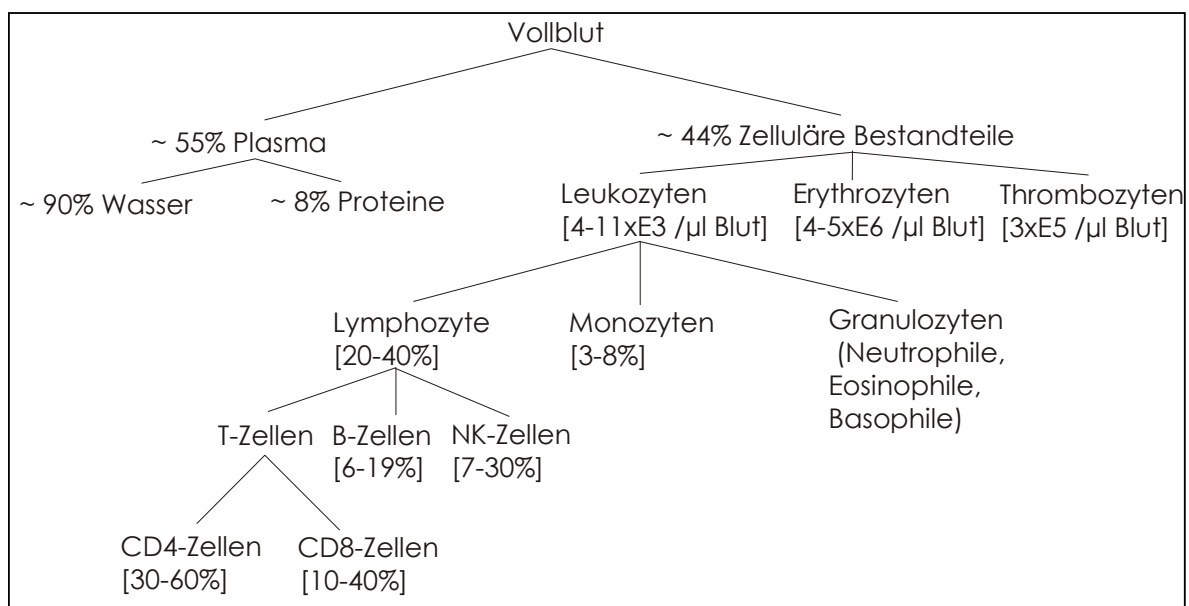


Abb. 9 Zusammensetzung Vollblut

3.9.1.1 Gewinnung von humane Primärzellen

Für die Aufreinigung humaner PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) wurden frisch isolierte humane Leukozyten verwendet. Zur Gewinnung der Primärzellen wurde gesunden Probanden mittels Monovetten (0,105M Tri-Natriumacetat als Gerinnungshemmer, Sarstedt) oder Vacutainern (0,105M Tri-Natriumacetat als Gerinnungshemmer, BD Bioscience) venöses, peripheres Vollblut entnommen und aufgearbeitet.

Für die Separation von Monozyten wurde sowohl frisches Vollblut als auch Buffy Coats aus der Eigenblutspende der Charité verwendet.

Als Buffy Coat bezeichnet man die Fraktion der Vollblutspende, welche nach Zentrifugation des Vollblutbeutels (Komponententrennung, Vollblutbeutel enthält als gerinnungshemmende und stabilisierende Wirkstoffe 26,3 g Natriumcitrat-Dihydrat, 3,27 g Citronensäure-Monohydrat, 25,8 g Glucose-Monohydrat, 2,51 g Natrium-Dihydrogenphosphat-Dihydrat) und Abnahme des Plasma- und Erythrozytenanteils übrig bleibt. Der Buffy Coat beinhaltet demnach Leukozyten, Thrombozyten und einen Teil der Erythrozyten.

Sowohl die Entnahme des venösen, peripheren Vollblutes mittels 3-fach-Beutelsystem als auch die Präparation der Buffy Coats wurde von den Schwestern der Eigenblutspende durchgeführt.

Für die anschließende Präparation der Zellen und der Zellkultur wurden ausschließlich endotoxinfreie Medien und Reagenzien verwendet.

3.9.1.2 Dichtegradientenzentrifugation zur Aufreinigung der Zellen

Zur Auftrennung der PBMCs von den restlichen Blutkomponenten wurden 15ml Biocoll in ein 50ml Falconröhrchen vorgelegt, vorsichtig mit verdünntem (1:3 mit PBS) Vollblut bzw. Buffy Coat überschichtet und 20min bei 900g bei minimaler Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennen sich die mononukleären Zellen (MNC) vom Plasma, von den Erythrozyten und von den Granulozyten. Die MNCs, zu denen Monozyten, B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen gehören, sind nach der Zentrifugation als dünne intermediäre Schicht zwischen Plasma und Biocoll sichtbar und können mittels einer Pasteurpipette separiert werden. Um eventuelle Biocoll- und Plasmarückstände zu entfernen, wurden die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 300g 10min). Nach dem 2. Waschschriff wurde das Pellet mit Medium (25-50ml) resuspendiert, ein weiteres mal zentrifugiert (10min, 270g) und je nach Zellzahl in 1-5ml Medium (RMPI komplett) aufgenommen.

3.9.2 Zellseparation

Es wurden zwei verschiedene Aufreinigungsmethoden verwendet. Zum einen die Positivseparation mittels magnetisch-markierter Antikörper und zum anderen die Negativseparation mit einem Antikörpermisch, durch den es zu einer Rosettenbildung zwischen markierten Zellen und Erythrozyten kommt, welche mittels Dichtegradientenzentrifugation entfernt werden können. Die magnetische Positivseparation bietet eine hohe Reinheit der Zellen (Monozyten: mind. 90% Reinheit [73]), jedoch sind die gewonnenen Zellen mit einem Antikörper markiert. Die Reinheit der durch Negativseparation gewonnen Zellen war etwas niedriger (Monozyten: durchschnittlich 86% Reinheit), es zeigte sich jedoch, dass die langfristige Viabilität der unmarkierten Zellen tendenziell besser war. Daher wechselten wir bei längeren Inkubationsdauern von der anfänglich verwendeten Positivseparation mittels magnetisch-

markierten Antikörper zu der Negativseparation mit Hilfe des RosetteSep Monocyte Enrichment Cocktails.

3.9.2.1 Positivseparation von Monozyten, B-Zellen und T-Zellen mittels MACS (Magnetic Bead Associated Cell Sorter)

Mit Hilfe von magnetisch markierten spezifischen Antikörpern (Beads), ferromagnetischen Säulen und einem Magneten können die jeweiligen Zellpopulationen der aufgereinigten MNCs voneinander getrennt werden. Für die Isolation der Monozyten wurden CD14-spezifische Beads, für die Isolation von B-Zellen CD19-spezifische Beads und für die Isolation von T-Zellen CD3-spezifische Beads verwendet.

Die jeweiligen Beads wurden nach Herstellerangaben (Miltenyi Biotec) mit 20µl / 10^7 Zellen / 100µl MACS-Puffer (PBS + 2% FCS) eingesetzt und der Ansatz für 15min bei 4-8°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit ~40ml kaltem (4-8°C) MACS-Puffer gewaschen und das durch Zentrifugation (10min, 250g, 4°C) gewonnene Zellpellet in 500µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert. Das Volumen richtet sich hierbei nach der Zellzahl, wobei maximal $\sim 5 \times 10^8$ Zellen in 500µl MACS-Puffer pro LS-Säule eingesetzt wurden. Zur Vorbereitung der verwendeten LS-Säulen wurden diese in den Magneten gehängt und mit 3ml kaltem MACS-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension mittig auf die Säule pipettiert und dreimal mit 3ml kaltem MACS-Puffer gewaschen. Dabei bleiben die markierten Zellen auf der Säule hängen, während alle nicht markierten Zellen durchlaufen. Um die markierten Zellen zu eluieren wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, über ein 15ml Falkonröhrchen platziert und die Zellen mit 5ml kaltem MACS-Puffer und mit Hilfe des Stempels aus der Säule gedrückt, in Medium (RPMI komplett) aufgenommen und gezählt.

3.9.2.2 Negativseparation von Monozyten mittels RosetteSep Monocyte Enrichment Cocktail

Mit Hilfe eines Antikörpergemisches (RosetteSep Monocyte Enrichment Cocktail, Stem Cell Technologie) können die Monozyten direkt aus dem Vollblut gewonnen werden. Der kommerziell erhältliche Cocktail enthält einen Mix aus monoklonalen Antikörpern, welche spezifisch gegen die Zelloberflächenantigene der unerwünschten Zellen (CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, CD66b), sowie gegen Glycophorin A auf Erythrozyten sind. Durch den Antikörpercocktail werden die nicht benötigten Zellen mit den Erythrozyten vernetzt, so dass sich sogenannte Immunrosetten bilden, die mittels Dichtegradientenzentrifugation von den unmarkierten Monozyten getrennt werden können.

Pro ml Vollblut wurden 20µl Antikörpercocktail direkt zum Vollblut gegeben und nach 20minütiger Inkubation bei RT das Blut 1:3 mit Rosette-Puffer (PBS + 2% FCS + 1mM EDTA) verdünnt. Anschließend wurden die Monozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation (20min, 1200g,

minimale Beschleunigung und ohne Bremse) isoliert. Die so gewonnenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 10min, bei 300g), in Medium (RPMI komplett) aufgenommen und gezählt.

3.9.3 Zellzählung

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden die an den Ecken des Zählfeldes gelegenen vier Großquadrate, bestehend aus 16 kleineren Quadraten, ausgezählt.

Zur Zählung wurden aus der Gesamtzellsuspension 10µl entnommen, in ein 0,5ml-Eppendorfgefäß überführt und mit 3% Essigsäure so verdünnt, dass die zu zählende Zellzahl über 1×10^6 Zellen/ml lag. Die zur Zählung verwendete Essigsäure degradiert die Zellmembran von Erythrozyten, so dass diese platzen und bei der Zellzählung nicht stören.

Die Formel zur Berechnung der Zellzahl pro ml lautet wie folgt:

$$\frac{\text{Ermittelte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{4}$$

Das Einstellen der gewünschten Zellzahl erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit Medium (RPMI komplett).

3.9.4 Zellkultur und Stimulationen

Die aufgereinigten Zellen wurden in Medium (RPMI komplett) aufgenommen und mit einer Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml in die jeweilige Zellkulturplatte überführt. In 48-Loch-Zellkulturplatten wurde pro Vertiefung ein Endvolumen von 500µl Zellsuspension (inkl. Stimulus) verwendet, was einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/Ansatz entsprach. In 96-Loch-Zellkulturplatten wurde ein Endvolumen von 200µl pro Vertiefung verwendet ($0,4 \times 10^6$ Zellen/Ansatz).

Bei allen Ansätzen wurden ausschließlich endotoxinfreie Medien und Lösungen verwendet.

Zur Induktion der HO-1 Expression wurden die Zellen 15h mit 30µM CoPP, bzw. mit 30µM Hämin bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Stocklösungen von CoPP [2mM] und Hämin [20mM] wurden in Medium (RPMI komplett) verdünnt. Die Kontrollen enthielten nur Medium (RPMI komplett). Die eingesetzte Konzentration von CoPP entsprach der höchstmöglichen, nicht toxischen Konzentration (Zellviabilität überprüft mittels Trypanblau-Färbung), bei der eine maximale HO-1 Expression zu detektieren war. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Versuche mit den oben genannten CoPP- und Hämin-Konzentrationen und einer 15-stündigen Präinkubation durchgeführt. Bei Abweichungen wird dies in der Legende des jeweiligen Experimentes beschrieben.

Um die verwendeten Porphyrine nach der Präinkubation wieder zu entfernen, wurden die Zellen drei Mal mit Medium (RPMI komplett) gewaschen. Bei einer Inkubation in einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurde das Volumen entsprechend reduziert und die Waschschriffe auf fünf Wiederholungen erhöht (Zentrifugation 5min bei 250g). Anschließend wurde das Volumen wieder auf die ursprüngliche Menge aufgefüllt und die Zellen weitere 24h mit dem jeweiligen Stimulus bei 37°C, 5 % CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die verwendeten Inhibitoren wurden in der Regel zusammen mit CoPP und Hämin zu den Zellen gegeben.

Zum Blockieren von CD163 (Hämoglobin-scavenger Rezeptor) wurde der anti-CD163 Antikörperklon EDHu-1 verwendet. Um ein optimales Blockieren des Rezeptors zu gewährleisten wurden die Zellen ($4,4 \times 10^5$ Zellen/200µl) 30min mit dem Antikörper im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) vorinkubiert, bevor sie für 15h mit CoPP bzw. Hämin inkubiert wurden.

Die verschiedenen Stimulantien und Inhibitoren wurden mit den in Tab. 3 aufgelisteten Endkonzentrationen eingesetzt. Dabei erfolgte die Verdünnung immer in Medium (RPMI komplett). Die eingesetzten Konzentrationen sind zudem in der jeweiligen Legende des Experimentes aufgeführt.

Tab. 3 Die verwendete Stimulantien und Inhibitoren

<u>Substanz</u>	<u>Stockkonzentration</u>	<u>Endkonzentration</u>
anti CD163 EDHu1	667µg/ml	1, 10, 20, 50µg/ml
anti IL10	3mg/ml	10µg/ml
CMV-Lysat		4µg/ml
CoPP	2mM	30µM
Gö6850	4,8mM	10nM
Hämin	20mM	30µM
Hb	20mg/ml	1mg/ml
HbHg		1mg/ml
IE1-Peptidmix	1mg/ml	4µg/ml
IFN- γ	200µg/ml	0,1ng/ml
IL10	1mg/ml	10ng/ml
JSI124	1,94mM	2,5µM
pp65-Peptidmix	1mg/ml	4µg/ml
Rb-8-Br-cAMP	50mM	100ng/ml
SB 203580	1mg/ml	10ng/ml
SP 600125	5mM	10µM
TSA	4mM	1, 10, 100ng/ml
Wortmannin	2mM	5µM

3.9.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence associated cell sorter) ermöglicht die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen in einer wässrigen Lösung. Die Messung erfolgte am FACS-Calibur (BD Biosciences, Heidelberg) mit der zugehörigen Cellquest-Software.

3.9.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Messung unterschiedlicher optischer Signale (Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale) einzelner Zellen bzw. Partikel. Monochromatisches Licht, welches auf ein Partikel oder eine Zelle trifft, wird in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung gestreut. Das Ausmaß der Vorwärtsstreuung (FCS; Lichtbeugung) gibt dabei Aufschluss über die Granularität der Zelle und die Seitwärtsstreuung (SSC; Lichtbrechung) über die Zellgröße. Das zweite messbare optische Signal ist die Fluoreszenz. Diese entsteht wenn ein Atom oder Molekül ein Photon höherer Energie absorbiert und später ein Photon niedriger Energie emittiert. Verbindungen, die dazu in der Lage sind, nennt man Fluorochrome. Der Frequenzbereich, der eine fluoreszierende Verbindung anregen kann, entspricht dem Absorptionsspektrum und die abgegebene Fluoreszenz dem Emissionsspektrum des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs.

Das FACS-Calibur besitzt zwei luftgekühlte Laser, welche monochromatisches Licht mit 488nm und 633nm Wellenlänge aussenden. Die Anordnung der Laser und Fluoreszenzdetektoren ist in Abb. 10 dargestellt. Die „Light Scatter Diode“ detektiert das Vorwärtsstreulicht (FCS) und der „90 degree Light Scatter“ das Seitwärtsstreulicht (SSC). Die vier Fluoreszenzdetektoren (FL1-FL4) detektieren die, von den angeregten Farbstoffen (Fluorochrome) ausgesendeten verschiedenen Emissionswellenlängen. Die aufgenommenen Signale werden von der Cellquest-Software in einem X-Y-Graphen visualisiert, so dass Zellunterschiede auf Grund ihrer Größe, Granularität und Antikörpermarkierung (Fluoreszenz) sichtbar werden.

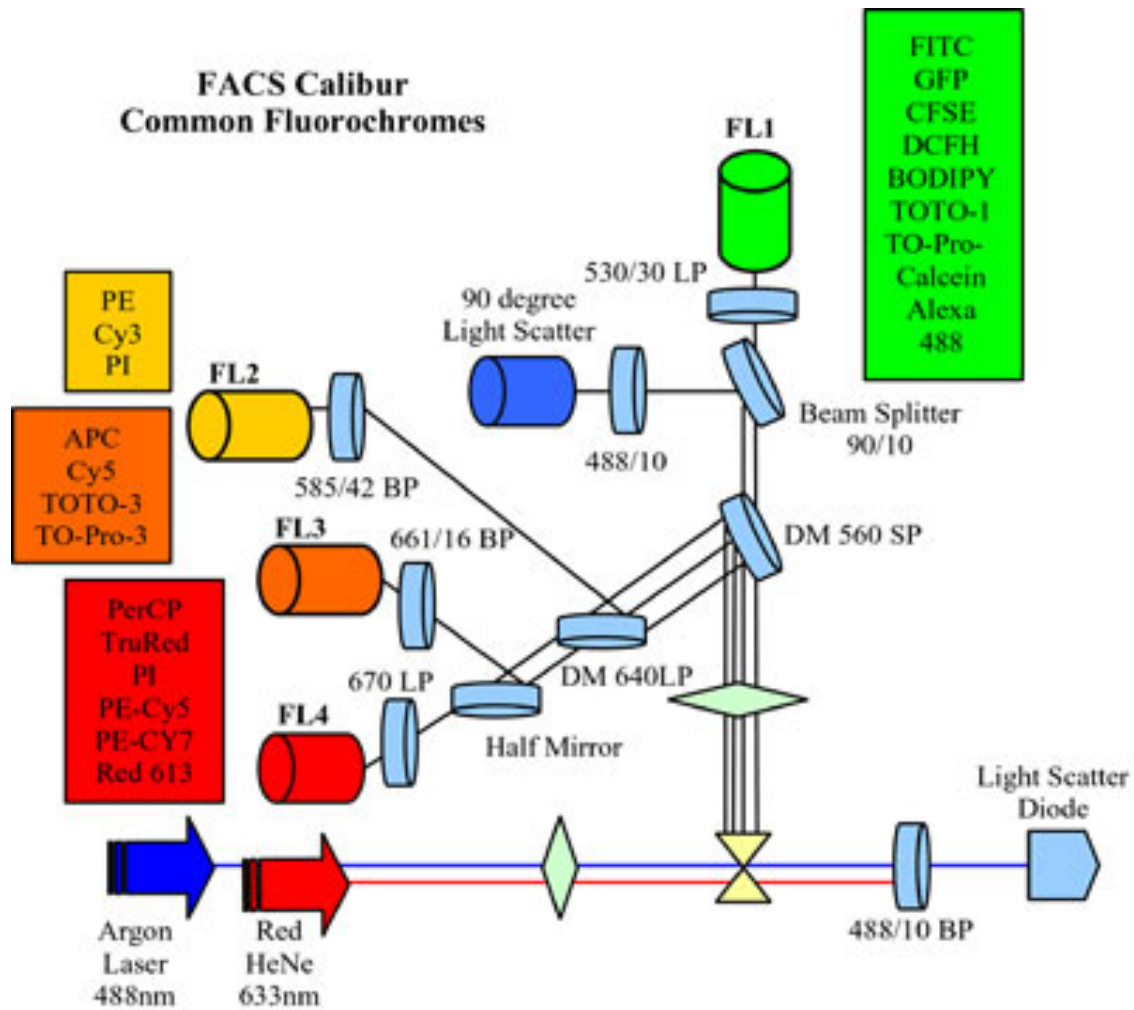


Abb. 10 Anordnung der Laser und Fluoreszenzdetektoren im FACSCalibur

FACSCalibur optical Pathway, www.niaid.nih.gov

Zur genauen Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenantigene oder intrazelluläre Proteine markiert. Die Antikörper sind dabei mit verschiedenen Fluorochromen markiert und können so durch ihre Fluoreszenz detektiert und unterschieden werden.

Die verwendeten Fluorochrome mit ihren entsprechenden Emissionsspektren sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Tab. 4 Die verwendeten Fluorochrome und ihr jeweiliges Emissionsspektrum

<u>Fluorochrom</u>		<u>Anregungswellenlänge</u>	<u>Emissionspeak</u>
Alexa 488		488nm	530nm
Alexa 647		633nm	670nm
APC	Allophycocyanin	633nm	660nm
FITC	Fluoresceinthiocyanat	488nm	525nm
PE	Phycoerythrin	488nm	575nm
PE-Cy5	Phycoerythrin cyanine dye5	488nm	670nm
PE-Cy7	Phycoerythrin cyanine dye7	488nm	767nm
PerCP	Peridinin chlorophyll protein	488nm	675nm
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein	488nm	695nm
	Cyanine dye5.5		

3.9.5.2 Identifikation der Zellpopulationen und Überprüfung der Reinheit nach Zellseparation

Bei der Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen macht man sich zu Nutze, dass diese jeweils spezifische Oberflächenmarker aufweisen, mit denen die einzelnen Zelltypen unterschieden werden können. So lassen sich Monozyten durch ihre Größe und ihre Granularität, aber auch durch die Expression des PRR CD14 differenzieren. T-Zellen unterscheiden sich von den anderen Zelltypen durch die Expression des T-Zell-Corezeptors CD3, welcher sowohl von CD4-positiven als auch CD8-positiven T-Zellen exprimiert wird. Der für B-Zellen typische Oberflächenmarker ist CD19, ein Corezeptor des B-Zell-Rezeptors.

Mit Hilfe eines Antikörpermisches (Diff-Mix), welcher spezifische Antikörper gegen die jeweiligen Oberflächenmarker der verschiedenen Zelltypen enthält, lassen sich die unterschiedlichen Zellpopulationen voneinander diskriminieren.

Für die Markierung (Färbung) der Zellsubtypen wurden 50µl Zellsuspension [1×10^6 Zellen/ml] mit 10µl Antikörper-Mix für 30min bei 4-8°C im Dunkeln in einem Micronic-Röhrchen inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurde die Zellsuspension in 1ml FACS-Puffer resuspendiert und anschließend zentrifugiert (5min, 250g, RT). Der Überstand wurde, bis auf ein Restvolumen von ca. 100µl, abgesaugt und die Zellen mittels Durchflussszytometrie analysiert.

In folgender Tabelle findet sich eine Auflistung der im Antikörper-Mix (Diff-Mix) zur Differenzierung verschiedener Zellpopulationen enthaltenen Antikörper.

Tab. 5 Antikörper-Mix (Diff-Mix) zur Differenzierung verschiedener Zellpopulationen

<u>Fluorochrom</u>	<u>Antikörper-Spezifität</u>	
FITC	CD2	NK-Zellen, T-Zellen
	CD16	NK-Zellen, Granulozyten
PE	CD3	T-Zellen
	CD19	B-Zellen
PerCP	CD45	Leukozyten (alle hämatopoetischen Zellen)
APC	CD14	Monozyten

Die Leukozyten wurden zunächst an hand ihrer CD45-Expression identifiziert und anschließend die Zellsubtypen mittels CD3, CD19, CD2 und CD16 diskriminiert. In Abb. 11A sind die verschiedenen PBMC-Zellpopulationen zu erkennen. Die CD19 positiven, aber CD2 und CD16 negativen B-Zellen lassen sich dabei gut von den CD3 und CD2 positiven T-Zellen unterscheiden. Zudem können die CD2 und CD16 positiven NK-Zellen diskriminiert werden, die im Gegensatz zu T-Zellen, kein CD3 exprimieren. Monozyten sind negativ für CD3, CD19 und CD2 und exprimieren wenig CD16 und lassen sich daher in dieser Darstellung schwieriger abgrenzen. Nach der Monozyten-Aufreinigung können jedoch eventuelle Verunreinigungen mit anderen Zelltypen erkannt werden (Abb. 11B). Eine eindeutige Diskriminierung der Monozyten ist mit Hilfe ihrer CD14-Expression und ihrer Granularität möglich. In der Abb. 8C sind PBMC dargestellt, wobei die untere Population alle CD14 negativen Zellen (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen) zeigt. Von diesen Zellen lassen sich gut die granuläreren CD14-positiven Monozyten unterscheiden, die in der oberen Bildhälfte zu erkennen sind. Vor der Separation enthalten PBMC ca. 5-10% Monozyten (Abb. 11C). Nach der Aufreinigung mit MACS oder RosetteSep bleiben, wie in Abb. 8D gut zu erkennen, die CD14-positiven Monozyten (Abb. 11D) übrig.

In allen mit aufgereinigten Monozyten durchgeführten Experimenten lag die Reinheit der Monozyten bei durchschnittlich 86%. (Verunreinigung mit B-Zellen unter 1%).

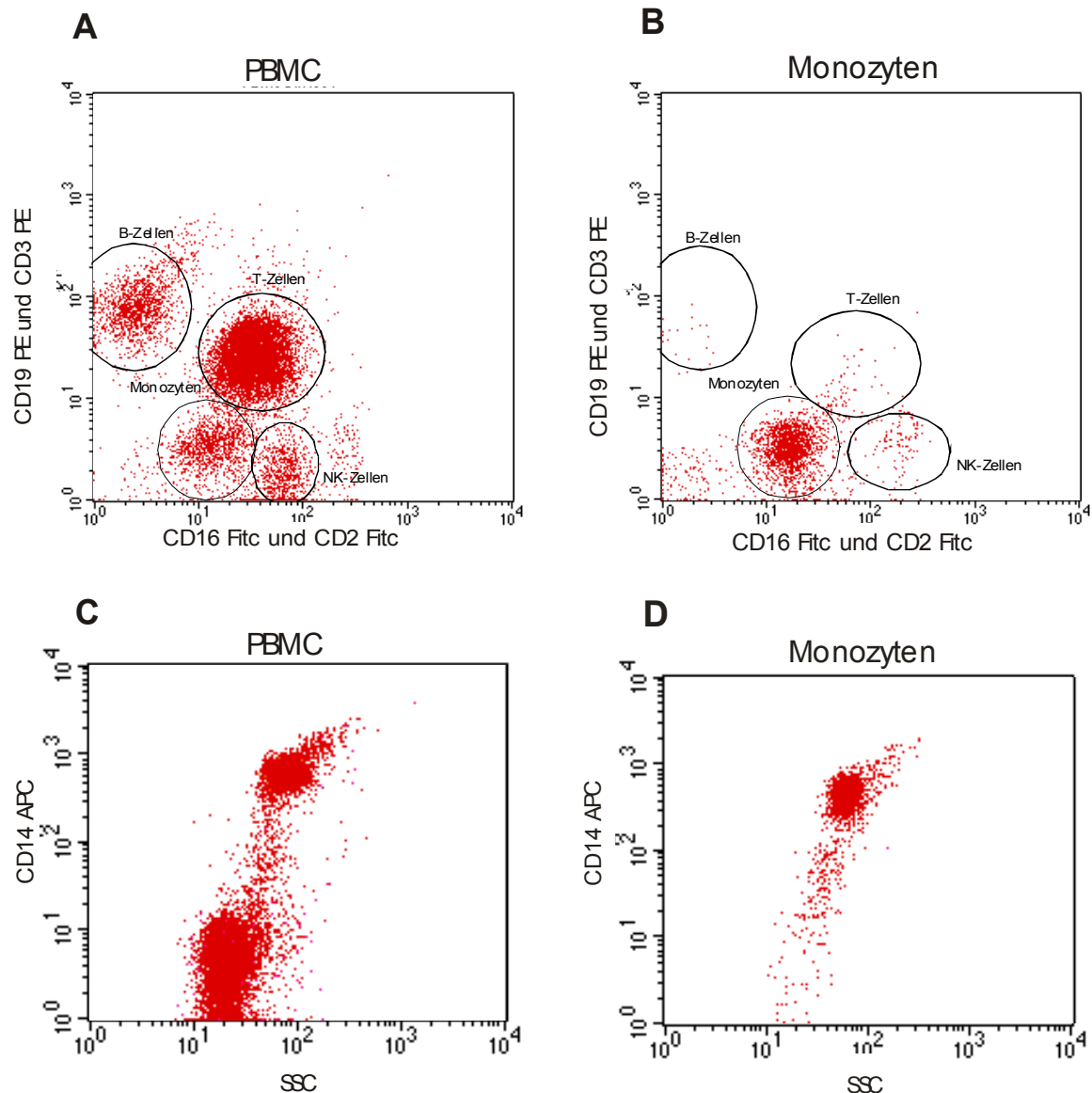


Abb. 11 FACS-Färbung von PBMCs (A) und separierten Monozyten (B)

1×10^6 PBMCs bzw. Monozyten in einem Volumen von 50 μ l wurden 30min mit 10 μ l Diff-Mix bei 4-8°C inkubiert, anschließend mit FACS-Puffer gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.9.6 Analyse der HLA-DR Expression

Zunächst wurden die kultivierten Zellen mittels kaltem PBS aus der Zellkulturplatte gelöst und in ein Micronic-Röhrchen überführt. Um sicherzustellen, dass alle Zellen abgelöst wurden (Kontrolle mittels Mikroskop), wurde jede Vertiefung mindestens 3x mit eiskaltem PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen 5min bei 250g und RT abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 50 μ l abgenommen.

3.9.6.1 FACS-Färbung der HLA-DR Oberflächenexpression von Monozyten

Die aus den Zellkulturplatten gelösten und in Micronic-Röhrchen überführten Zellen (96-Loch-Zellkulturplatte: $0,4 \times 10^6$ Zellen; 48-Loch-Zellkulturplatte: 1×10^6 Zellen) wurden abzentrifugiert (5min, 250g, RT) und der Überstand bis auf ca. 50µl abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in dem verbleibenden Volumen resuspendiert und mit einem Antikörpermix aus 5µl anti-CD14-APC/Ansatz und 5µl anti-HLA-DR-PE/Ansatz gemischt. Der Färbeansatz wurde 30min im Dunkeln bei 4-8°C inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen wurden die Zellen anschließend mit 1ml FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert (5min, 250g, RT) und der Überstand bis auf ~100µl Restvolumen abgesaugt. Sofort im Anschluss wurden die gefärbten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.9.6.2 FACS-Färbung der intrazellulären HLA-DR-Expression von Monozyten

Um die intrazelluläre HLA-DR Expression zu analysieren, mussten zunächst die oberflächlichen HLA-DR Moleküle mit einem unmarkierten anti-HLA-DR Antikörper blockiert werden. Dazu wurden die Zellen mit 100µl unmarkiertem anti-HLA-DR Antikörper (Klon L243) [Stockkonzentration 25µg/ml] 20min bei 4°C inkubiert, anschließend zweimal mit BSA-Puffer gewaschen (jeweils 1ml BSA-Puffer, Zentrifugation 5min, 250g, 4°C) und für 15min mit 500µl Perm2-Puffer bei RT inkubiert. Perm2 fixiert und permeabilisiert die Zellen, so dass im nachfolgenden Schritt das intrazelluläre HLA-DR angefärbt werden kann. Dazu wurden die Zellen mit 1ml Saponin-Puffer gewaschen, abzentrifugiert (5min, 250g, 4°C), in 100µl Saponin-Puffer resuspendiert und mit 3µl anti-HLA-DR-PE (Klon L243) und 5µl anti-CD14-APC 20min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden überschüssiger Antikörper durch einen weiteren Waschschrift mit 1ml Saponin-Puffer entfernt (Zentrifugation 5min, 250g, 4°C). Als Kontrolle wurde in zwei weiteren Ansätzen das Blockieren der oberflächlichen HLA-DR-Moleküle überprüft und die HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche analysiert. Die Zellen wurden nach der 20minütigen Inkubation mit dem unmarkierten anti-HLA-DR Antikörper 15min bei RT mit 500µl 2%igen PFA (Paraformaldehyd)-Lösung fixiert und anschließend 20min bei 4°C mit 3µl anti-HLA-DR-PE und 5µl anti-CD14-APC inkubiert. Bei optimaler Blockierung der oberflächlichen HLA-DR-Moleküle waren die Zellen bei der anschließenden FACS-Analyse negativ für HLA-DR, da die Bindung des markierten HLA-DR-Antikörpers durch den unmarkierten Antikörper blockiert wurde. Für die Oberflächenfärbung wurden die Zellen 15min mit 500µl 2%iger PFA-Lösung (RT) fixiert, anschließend mit 3µl anti-HLA-DR-PE und 5µl anti-CD14-APC 20min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Am Ende wurde das Zellpellet jeweils in 200µl FACS-Puffer resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.9.7 Färbung der intrazellulären STAT-1-Phosphorylierung

Unbehandelte oder mit CoPP vorbehandelte Zellen [1×10^6] wurden, wie in Kapitel 3.9.6 erläutert, in Micronic-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (5min, 250g, RT) und anschließend der gesamte Überstand abgesaugt. Zur Stimulation der STAT-1-Phosphorylierung wurde das Zellpellet in 50µl IFN- γ -enthaltendes Medium (RPMI komplett + 0,1ng/ml IFN- γ) resuspendiert und 15min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Monozytendifferenzierung wurde 10µl anti-CD14-PerCP-Antikörper zu jedem Ansatz pipettiert. Nach der Stimulation wurde 1ml 1xBD-Lyse-Puffer (enthält PFA zur Fixierung der Zellen) zu den Zellen gegeben und diese 10min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 5min, 300g, 4°C), in 500µl eiskaltem Methanol [90%ig] resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5min, 250g, 4°C), in 1ml 1xFACS-Perm-Lösung resuspendiert und 10min im Dunkeln bei RT inkubiert. Beide Schritte dienen der Permeabilisierung der Zelloberfläche, so dass anschließend intrazelluläre Proteine mit Antikörpern markiert werden können. Für die intrazelluläre Färbung wurde das durch Zentrifugation (5min, 300g, 4°C) gewonnene Pellet in einer Antikörperlösung aus 10µl STAT-1-Alexa 488 und 40µl FACS-Puffer resuspendiert und 1h im Dunkeln bei RT inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen wurden die Zellen nach der Inkubation zweimal mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 5min, 300g, 4°C), das Pellet in 200µl FACS-Puffer resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.9.8 Färbung der intrazellulären STAT-3-Phosphorylierung

Die Färbung wurde nach Herstellerangaben (BD Biosciences, Heidelberg) wie im Phosflow-Protokoll III angegeben durchgeführt.

1×10^6 Zellen wurden in ein Micronic-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (5min, 250g, RT), möglichst der gesamte Überstand abgesaugt und das Pellet in 1ml vorgewärmten BD Cytotfix Puffer für 10min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5min bei 250g und RT zentrifugiert und das Pellet für die anschließende Permeabilisierung in 1ml BD Phosflow Perm Puffer III resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, mit 3µl anti-Phospho-STAT3-PE Antikörper resuspendiert und 30min im Dunkeln bei RT inkubiert. Um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 5min, 250g, RT) und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Stabilität der verwendeten Antikörper wird u.a. von den verwendeten Fixierungs- und Permeabilisierungs-Puffern beeinflusst. Bei der Markierung der intrazellulären STAT-3-Phosphorylierung war eine direkte Färbung der Monozyten mit CD14 Antikörpern nicht möglich,

da kein CD14-Antikörper-Klon zur Verfügung stand, der bei Verwendung der notwendigen Puffer stabil genug für die anschließende Analyse mittels Durchflusszytometrie war. Aus diesem Grund wurden die Monozyten ausschließlich an Hand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) identifiziert.

3.9.9 Gene knock down mittels small interference RNA

Small interference RNAs (siRNA) sind kurze doppelsträngige RNA-Stücke, welche eine Inhibierung der Genomexpression auslösen können. Dieser Vorgang wird als RNA Interferenz (RNAi) bezeichnet und dient ursprünglich dem Abwehren von Viren, welche, je nach Virus, doppelsträngige RNA (dsRNA) in die Zielzelle bringen.

Die dsRNA wird in der Zielzelle erkannt und zunächst durch Dicer (RNase III-ähnliche Moleküle) in kurze doppelsträngige RNA-Stücke (siRNA) zerschnitten. Als nächstes wird der Doppelstrang der siRNA durch den RNA-inducing-silencing-complex (RISC) gespalten und der Antisense-Strang an den Komplex gebunden. Der RISC-Antisense-Strang-Komplex bindet anschließend komplementär an die passende mRNA der Zelle. Die so markierte mRNA wird gespalten und durch natürliche Verdauungsprozesse der Zelle abgebaut, so dass kein Genprodukt mehr entstehen kann (Abb. 12).

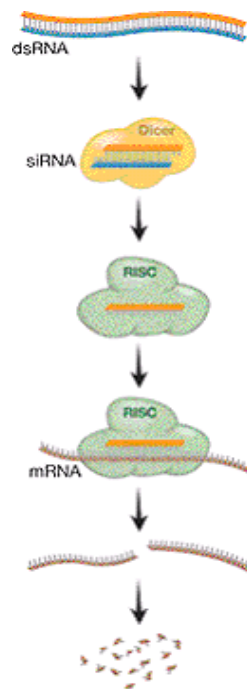


Abb. 12 Schema des RNAi-Mechanismus

<http://nobelprize.org>

Innerhalb molekularbiologischer Methoden ist der Einsatz von langer dsRNA jedoch ungeeignet, da diese in den meisten Zellen zu einer unspezifischen Toxizität durch Induktion von IFN- γ führt.

Dieses Problem umgeht man durch die Verwendung synthetisch hergestellter 21-23 bp langer siRNA. Diese haben den gleichen inhibitorischen Effekt, führen aber nicht zu einer IFN- γ Induktion.

3.9.9.1 Transfektion der siRNA mittels Elektroporation

Mit Hilfe dieses physikalischen Verfahrens wird die Zellmembran durch Elektroschocks für DNA und RNA durchlässig gemacht. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zu einer Polarisierung der Membran. Erreicht die dadurch entstehende transmembrane Spannung einen kritischen Wert von 0,4–1V, kommt es zu einer lokalen Zerstörung der Membranintegrität und damit zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit. So entstandene hydrophobe Poren verwandeln sich bei Erreichen eines kritischen Radius in relativ stabile (wenige Sekunden bis einige Stunden), hydrophile Poren mit einem Durchmesser von 0,7 –1nm [119] . Durch diese Poren diffundiert dann die siRNA in die Zelle.

Die Nucleofektion wurde nach Protokoll des Herstellers (Amaxa biosystems, Köln) durchgeführt. Verwendet wurde der Amaxa Nucleofector® II und das Programm Y-001. Die zu transfizierenden, frisch isolierten PBMCs bzw. separierten Monozyten wurden in der im Protokoll angegebenen Höchstkonzentration von 2×10^7 Zellen/Ansatz eingesetzt.

Verwendet wurden zwei verschiedene HO-1 siRNAs, welche sich in ihrer Sense-Sequenz unterscheiden. Dadurch wurde gewährleistet, dass es zu einer optimalen Inhibierung der HO-1 Expression kommt. Von der HO-1-spezifischen siRNA wurde jeweils 1 μ l und von der unspezifischen Kontroll-siRNA 2 μ l eingesetzt. Für die Transfektion wurden die Zellen abzentrifugiert und pro Ansatz 2×10^7 Zellen in 100 μ l NFS (Nucleofector solution) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit der jeweiligen Menge an siRNA gemischt, in die speziellen Transfektionsgefäße pipettiert und mit dem Programm Y-001 transfiziert. Anschließend war wichtig, dass die Zellen zügig im mitgelieferten Medium aufgenommen wurden. Dieses wurde vorher für eine halbe Stunde bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit äquilibriert. Bei zu langsamem Arbeiten kann es zu einem massiven Zellsterben kommen.

Die transfizierten Zellen wurden mit 2×10^6 Zellen pro Vertiefung einer 48-Loch-Zellkulturplatte ausgesät (Volumen 450 μ l). Bevor weiter Stimulantien zugegeben wurden, wurden die Zellen zwei Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit ruhen gelassen.

3.9.10 Proteinanalyse mittels Western Blot

Bei dieser Methode werden Proteine in einem Acrylamid-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

3.9.10.1 Probenvorbereitung

Um intrazelluläre Proteine zu analysieren müssen die Zellen zunächst lysiert werden. Dazu wurden die Zellen mit eiskaltem PBS aus der Zellkulturplatte gelöst, in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt, abzentrifugiert (5min, 1500 U/min) und das Pellet in 50µl Extraktpuffer, welcher 10µl Protease-Inhibitor enthält, lysiert. Um eine eventuelle Proteindegradation zu verhindern, wurden die lysierten Zellen sofort bei -80°C eingefroren und dort bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Für die Auftrennung wurden die Proteine denaturiert. Durch hohe Temperaturen (95°C) und Zugabe von Thiolverbindungen (z.B. β-Mercaptoethanol) werden die Disulfidbrücken der Quartärstruktur aufgebrochen und damit die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine aufgehoben. Die lysierten Zellen wurden dazu mit 10µl 6x SDS-Probenpuffer gemischt und 5min bei 95°C denaturiert. Durch die Beladung mit SDS bekommen die denaturierten Proteine eine negative Außenladung und laufen im elektrischen Feld vom Minus- (Anode) zum Plus- (Kathode) Pol. Die Auftrennung der Proteine ist nach ihrer Denaturierung ausschließlich von ihrer Größe und von der Porenweite des verwendeten Gels abhängig. Die Porenweite hängt dabei von der Menge an eingesetztem Acrylamid und vom Vernetzungsgrad des Gels ab. Je mehr Acrylamid verwendet wird, umso kleiner sind die Poren.

3.9.10.2 Gelelektrophorese mittels SDS-Polyacrylamidgel

Zur Herstellung eines Gels wurden folgende Reagenzien benötigt:

Tab. 6 Reagenzien für ein SDS-Polyacrylamidgel

Stammlösung	bestehend aus 30 % Acrylamid und 0,58 % Bisacrylamid
Tris/HCL	pH 8,8
Bidest. H ₂ O	
Ammoniumpersulfatlösung (APS)	dient als Katalysator für die Polymerisierung von Acrylamid. APS bildet im Wasser freie Radikale (SO ₄), die mit Acrylamid reagieren und eine Radikalkettenreaktion in Gang setzen, die zur Polymerisierung führt.
TEMED (N,N,N,N,- Tetramethylethyldiamin)	erleichtert die Radikalbildung des APS und dient somit als Katalysator der Polymerisation.
Isopropanol	

Für ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Trenngel wurden 2,5ml Stammlösung, 1,2ml 1,88M Tris/HCL, 1,2ml 0,5%iges SDS, 1,1ml bidest. H₂O, 5µl TEMED und 30µl 10%ige

Ammoniumpersulfatlösung gemischt und luftblasenfrei in eine entsprechend vorbereitete Gelkammer gegossen. Um eine gerade Abschlusskante zu erhalten, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet und zur Aushärtung bei RT stehen gelassen. Für ein 5%iges Sammelgels wurden 330µl Stammlösung, 400µl 0,625M Tris/HCL, 400µl 0,5%iges SDS, 870µl bidest. H₂O, 2µl TEMED und 10µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung gemischt. Nach Aushärtung des Trenngels wurde das Isopropanol komplett abgenommen und das Sammelgel eingefüllt. Solange dieses noch flüssig war wurde ein Kamm mit 12 Probestaschen luftblasenfrei in die Kammer gesteckt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer gespannt, mit SDS-Laufpuffer geflutet und der Kamm entfernt. Anschließend wurden die Taschen mit dem Laufpuffer gespült und mittels einer dünnen Spritze jeweils 20µl der denaturierten Proben eingefüllt. Um die Proteinbanden eindeutig diskriminieren zu können, wurde zudem ein Proteinmarker aufgetragen, welcher Banden definierter Größe zeigt. Die Auftrennung lief, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, mit ~80V und anschließend für ca. 1-1½ Stunden, bis die einzelnen Markerbanden gut voneinander getrennt waren, bei 120V.

3.9.10.3 Semi-Dry-Blotting

Nach der Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine mittels Semi-Dry-Blotting auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Dazu wurden insgesamt 6 Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran für ca. 10min in Transferpuffer äquilibriert und anschließend ein „Sandwich“ nach folgendem Schema aufgebaut: 3 Filterpapiere, Nitrocellulosemembran, Gel, 3 Filterpapiere (Abb. 13). Transferiert wurde für eine Stunde bei 100mA.

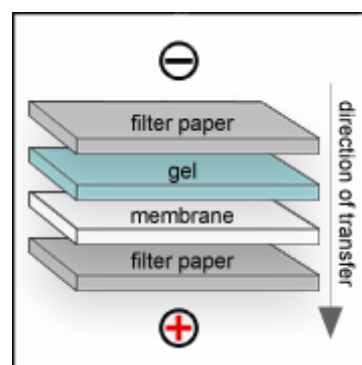


Abb. 13 Schema eines Semi-dry-blotting „sandwich“

Georgia Institute of Technologie School of Biomedical Engineering

3.9.10.4 Ponceau-Färbung

Zur Kontrolle des Transfers und der gleichmäßigen Beladung wurde die Membran reversibel mit Ponceau gefärbt. Der saure Diazofarbstoff färbt unspezifisch Proteine und lässt sich durch Waschen mit TBS-T leicht wieder entfernen.

Für die Ponceau-Färbung wurde die Membran komplett mit dem Ponceau-Farbstoff benetzt, nach 2-3 min Färbezeit der Farbstoff wieder entfernt und die Membran mit dest. H₂O gespült bis die Hintergrundfärbung soweit entfernt war, dass sich die Proteinbanden gut von dem Hintergrund abheben. Zur Dokumentation wurde die Membran eingescannt und anschließend durch mehrmaliges Spülen mit TBS-T wieder komplett entfärbt.

3.9.10.5 Immunfärbung und Visualisierung der Proteinbanden

Verwendet wurden zwei unterschiedliche Visualisierungsmethoden. Zum einen die klassische Visualisierung mittels ECL (Enhanced ChemiLuminescence)-Reagenz und Photofilm und zum andern die Visualisierung mit dem ODYSSE Infrared Imaging System von LiCor-Biosciences.

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung aufgelistet.

Tab. 7 Verdünnungen der verwendeten Western Blot-Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	
anti-HO-1	1:1000 in 5%ige Milchlg. oder in Li-Cor Blocking Solution
anti-Phospho-STAT-1	1:1000 in 5%ige BSA-Lsg. oder in Li-Cor Blocking Solution
anti-Phospho-STAT-3	1:1000 in 5%ige Milchlg. oder in Li-Cor Blocking Solution
<u>Sekundärantikörper für ECL-Entwicklung</u>	
anti-mouse AK	1:2000 in 5%ige Milch- oder 5%ige BSA-Lsg.
anti-rabbit AK	1:2000 in 5%ige Milch- oder 5%ige BSA-Lsg.
<u>Sekundärantikörper für Licor-Entwicklung</u>	
anti-mouse AK	1:10000 in Li-Cor Blocking Solution
anti-rabbit AK	1:10000 in Li-Cor Blocking Solution

3.9.10.6 Visualisierung mittels ECL (Enhanced ChemiLuminescence)

Zum Blockieren der freien Bindestellen auf der Membran wurde diese 1h mit 5%iger Milch- bzw. BSA-Lösung bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Wahl der Blockierungslösung richtet sich dabei nach dem Primär-Antikörper. Die Inkubation mit dem ebenfalls in 5%iger Milch- bzw. BSA-Lösung verdünntem Primär-Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler. Nach der Inkubation wurde die Membran 4x 10min mit TBS-T gewaschen und anschließend für 1h bei RT mit dem in 5%iger Milch- bzw. BSA-Lösung verdünntem Sekundär-Antikörper auf dem Schüttler

inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (4x 10min mit TBS-T) wurden die markierten Proteinbanden mit Hilfe des ECL Western Blotting Detection Reagens Kit der Firma Amersham Biosciences detektiert.

Bei der ECL-Visualisierung ist der Sekundär-Antikörper mit HRP- (Horseradish Peroxydase)-Enzym markiert, wodurch es nach Zugabe des entsprechenden Substrats zu einer detektierbaren Lumineszenz kommt. Lumineszenz entsteht, wenn angeregte Moleküle wieder in ihren stabilen Zustand zurückkehren, und dabei die freiwerdende Energie in Form von Licht abgeben. Chemilumineszenz ist ein chemischer Prozess, bei dem energiereiche, instabile Zwischenprodukte entstehen, die unter Lichtemission zerfallen (z.B. Luminol und Dioxethanen). Der Unterschied zur Fluoreszenz besteht im Wesentlichen darin, dass bei der Lumineszenz keine Wärme freigesetzt wird. Die Peroxydase HRP katalysiert die Umsetzung des Substrats Luminol in seine oxidierte Form. Die entstehende Chemilumineszenz wird verstärkt indem ein HRP-Molekül sehr viel Substrat umsetzen kann. Die dadurch sichtbar werdenden Banden werden mit Hilfe von Photofilmen detektiert.

Die Visualisierung der Banden auf dem Photofilm erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers, wobei 2ml Lösung A mit 50µl Lösung B (Substrat) gemischt und anschließend gleichmäßig auf die Membran gegeben und 5min, im Dunkeln, bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde die Membran auf einen Photofilm (High performance chemiluminescence film) aufgelegt und in einer Filmkassette mind. 10sec inkubiert. Die Dauer richtete sich dabei nach der erwarteten Bandenstärke. Die anschließende Entwicklung des Films erfolgte nach Herstellerprotokoll (Kodak) mittels einer kommerziell erhältlichen Entwickler- und Fixierlösung (GBX fixer and replenisher; GBX developer and replenisher).

3.9.10.7 Visualisierung mittels ODYSSE Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences)

Das ODYSSE-System basiert auf der Messung von Fluoreszenzen im Nahinfrarotbereich. Nahinfrarot (NIR) liegt im Spektralbereich von 780nm bis 3000nm und schließt sich direkt an den sichtbaren Spektralbereich des Lichtes (380-750nm) an. Die Detektion von Fluoreszenzen erlaubt eine quantitative Analyse, da die Fluoreszenz linear mit der Menge des Fluorochrom-markierten Antikörpers ansteigt und nicht, wie bei der Chemilumineszenz, von der umgesetzten Substratmenge abhängt. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass zwei unterschiedliche Fluoreszenzen (700nm und 800nm) detektiert und zwei Proteine gleichzeitig analysiert werden können.

Das Blockieren der freien Bindestellen auf der Membran erfolgte mittels speziellem Blockingpuffer (Li-Cor Blocking Solution, 1:2 mit PBS verdünnt) 1h bei RT auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem, in Li-Cor Blocking Solution verdünnten primären Antikörper (Tab. 7) inkubiert. Nach einem Waschschrift (4x 10min mit TBS-T) erfolgte die

Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper. Während man bei beiden Visualisierungsmethoden (ECL und ODYSSE) denselben primären Antikörper verwenden kann, benötigt man bei der ODYSSE-Methode einen speziellen Sekundär-Antikörper. Diese sind mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und erlauben somit eine einfache Diskriminierung auch nah beieinander liegender Proteinbanden. Der Sekundär-Antikörper wurde in Li-Cor Blocking Solution verdünnt und die Membran damit 1h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurde die Membran im letzten Schritt noch mal 4x 10min mit TBS-T gewaschen und anschließend am ODYSSE Infrared Imaging Reader analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels der dazugehörigen Quantifizierungssoftware.

3.9.11 Genexpressionsanalyse

3.9.11.1 RNA-Präparation

Verwendet wurde das Absolutely RNA[®] miniprep Kit der Firma Stratagen.

Die Methode macht sich zu Nutze, dass RNA in der Anwesenheit einer chaotropen^{c[120]} Salzlösung an eine Quarzglasfaser bindet und so von andern Zellkomponenten getrennt werden kann.

Zur Präparation wurde das Protokoll für Gewebekulturzellen des Herstellers benutzt.

Das Zelllysate wurde zunächst mit einer Ethanollösung gemischt und anschließend auf eine RNA-bindende Säule gegeben. Nach einem Waschschrift mit einer Salzlösung erfolgte der DNase-Verdau. Hier zeigte sich, dass eine 30minütige Inkubation mit der DNase bei 37°C effektiver war, als die angegebene 15minütige Inkubation. Anschließend wurde die immobilisierte RNA zweimal mit der mitgelieferten Salzlösung gewaschen und anschließend in zwei Schritten von der Säule eluiert. Dazu wurde die gebundene RNA zweimal 7min mit 30µl 60°C warmem Elutionspuffer inkubiert und anschließend durch Zentrifugation von der Säule gelöst.

3.9.11.2 cDNA-Synthese

Mit Hilfe reverser Transkriptase wird die isolierte mRNA (messenger RNA) in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben.

Die Präparation der cDNA läuft generell in drei Schritten ab.

Im ersten Schritt wird oligo dT (oligodesoxythymidylic acid) komplementär an den Poly(A)-Schwanz^{d[121]} der RNA gebunden. Dieses dient der folgenden Transkription als Anfangssequenz.

^c Chaotrope Salzlösungen haben die Eigenschaft Wasserstoffbrückenbindungen aufzulösen und somit denaturierend auf Proteine zu wirken. Zudem sättigen die Kationen der Salzlösung die negativen Ladungen der Glasfasern und machen sie somit positiv, so dass die negativ geladene Nukleinsäure binden kann.

Im zweiten Schritt wird durch Zugabe von DNase evtl. vorhandene DNA degradiert und somit verhindert, dass bei der folgenden cDNA-Synthese eine eventuelle DNA-Amplifikation das Ergebnis verfälscht. Im letzten Schritt, der Inkubation mit reverser Transkriptase, wird die RNA in cDNA umgeschrieben.

Für die cDNA Synthese wurden 18µl RNA mit 2µl oligo dT durch vortexen gemischt, kurz abzentrifugiert und 10min bei 75°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden die Proben anschließend auf Eis gestellt (mind. 2min). Zur Herstellung des 'dNTP'-Mixes wurden pro Probe 8µl 5x-Puffer, 4µl DTT (Dithiothreitol) und 4µl dNTP (Desoxynukleotide-Triphosphat) durch vortexen gemischt und 2µl DNase sowie 0,5µl RNase Inhibitor zugegeben. Anschließend wurden 18,5µl des 'dNTP'-Mixes zu der auf Eis stehenden Probe gegeben, das Ganze mittels Pipette gemischt und für 30min bei 37°C inkubiert. Direkt im Anschluss folgte eine 5minütige Inkubation bei 75°C bevor die Proben wieder auf Eis gestellt (mind. 2min) wurden. Anschließend wurde 1µl reverse Transkriptase und 1µl RNase Inhibitor zu jeder Probe pipettiert und der Ansatz 60min bei 42°C und anschließend 5min bei 94°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert und anschließend bei -80°C eingefroren.

3.9.11.3 Konventionelle PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird verwendet um kurze (bis zu 10kbp) DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Während der PCR werden die beiden Stränge der DNA durch hohe Temperaturen voneinander getrennt und mittels eines Primerpaares der Anfangs- und Endpunkt des zu amplifizierenden Stückes festgelegt. Dieser DNA-Abschnitt wird dann mit Hilfe einer DNA-Polymerase repliziert. Um qualitative Aussagen über die amplifizierten DNA-Abschnitte zu machen, werden diese anschließend in ein Agarosegel pipettiert und durch Anlegen einer elektrischen Spannung ihrer Größe nach aufgetrennt.

Zur Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnitts wurden der Go Tag ® DNA Polymerase Kit der Firma Promega verwendet. Es wurden pro Ansatz 5µl 5x Reaktionspuffer, 2µl Nukleotide, 1µl Vorwärts-, 1µl Rückwärtsprimer, 0,25µl Go TaqDNA-Polymerase, 14,75µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser und 1µl cDNA gemischt und mit dem in Tab. 8 angegebenen Programm im Thermocycler amplifiziert. Für eine optimale Amplifizierung wurden die Schritte 2-4 32-mal wiederholt.

^d Der Poly(A)-Schwanz besteht aus mehreren, aneinander geknüpften Adenin-Nukleotiden und ist essentiell für die Initiation der Translation. Diese Polyadenylierung ist nicht von der DNA kodiert, sondern wird während der Prozessierung der mRNA mittels Poly(A)-Polymerase an das 3'-Ende der prä-mRNA gebunden.

Zur Analyse der amplifizierten DNA wurde die Größe des DNA-Amplikates mit Hilfe eines 1,5%igen Agarosegels bestimmt. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 4,5g Agarose in 300ml TAE (Tri-Acetat-EDTA)-Puffer unter Erhitzen gelöst und nach Abkühlung (Handwarm) 10µl Ethidiumbromid (ein roter Phenanthridin-Farbstoff) dazu gegeben. Die handwarme Gelmasse wurde in eine vorbereitete Kammer gegossen, ein Kamm mit 22 Taschen eingehängt und bis zur vollständigen Polymerisierung stehen gelassen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde die Kammer mit TAE-Puffer geflutet und der Kamm entfernt. Die DNA-Amplikate wurden in die Taschen im Gel pipettiert und unter Anlegen einer Spannung (100V für 30-40min) aufgetrennt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid lagert sich während der Auftrennung zwischen den Basen der DNA an und verändert dadurch sein Anregungsspektrum, wodurch die DNA-Banden unter ultraviolettem Licht sichtbar werden. Um die Größe der Banden zu qualifizieren wurden bei jedem Gel ein 1kb-Marker aufgetragen, welcher Banden definierter Größe zeigt.

Tab. 8 Schema der konventionellen PCR

1.	2 Minuten	96°C	Denaturierung
2.	30 Sekunden	96°C	Denaturierung
3.	1 Minuten	60°C	Primerhybridisierung
4.	1 Minuten	72°C	Elongation
5.	10 Minuten	72°C	Elongation
6.	unendlich	4°C	Kühlen der Produkte

3.9.11.4 Real time PCR nach der TaqMan-Methode

Die real time PCR (RT-PCR) ermöglicht die Amplifikation der cDNA quantitativ über die Zeit zu verfolgen. Um dies zu ermöglichen sind zusätzlich zu den Primern sogenannte Sonden notwendig, welche für die jeweilige Zielsequenz spezifisch sind. An diesen Sonden ist ein fluoreszierender Reporterfarbstoff sowie ein Quencherfarbstoff gebunden. Solange beide Farbstoffe in räumlicher Nähe zueinander sind unterdrückt der Quencherfarbstoff die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs. Die eingesetzte Taq-Polymerase, die neben ihrer Fähigkeit DNA zu synthetisieren auch eine DNA-spaltende (5'Endonukleaseaktivität) Funktion besitzt, trennt den Reporterfarbstoff von der Sonde ab. Der Quencherfarbstoff verliert seinen Einfluss und der Reporterfarbstoff fluoresziert. Der Anstieg der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zu der Amplifikation des PCR-Produktes.

Verwendet wurde der TaqMan Universal PCR Mastermix der Firma Applied Biosystem, welcher die zur Reaktion benötigte AmpliTaq Gold ® DNA Polymerase, dNTP's und dUTP (Deoxyuridine-Triphosphat) enthält.

Zum Ansetzen des RT-PCR-Mixes wurden pro Probe 1,5µl dest H₂O, 12,5µl Mastermix, 6µl Primer und 1µl Sonde gemischt. Anschließend wurde 12µl Mix und 1µl cDNA in ein PCR-Gefäß pipettiert.

Nachdem die Proben in den Thermal Cycler (ABI PRISM™ 7700) gestellt und in das Gerät eingezogen wurden, wurde das RT-PCR-Programm gestartet. Die standardmäßig verwendete TaqMan-PCR bestand aus 4 Segmenten (1 Zyklus) welche 30-mal wiederholt wurden.

Tab. 9 Schema der RT-PCR

1.	2 Minuten	50°C	UNG-Verdau
2.	10 Minuten	95°C	Inaktivierung der UNG Aktivierung der AmpliTaqGold
3.	15 Sekunden	95°C	Denaturierung
	60 Sekunden	60°C	Annealing und Extension
4.		4°C	Kühlen der PCR-Produkte

Nach Beendigung des Laufes wurden die Daten mit der Sequence Detection Software analysiert und man erhielt die entsprechenden ct-Werte (cycle threshold). Der ct-Wert ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Je mehr cDNA eines Gens in der Probe war, umso niedriger ist der ct-Wert, d.h. umso früher erreicht die Fluoreszenz den Schwellenwert. Zum Auswerten wurden die erhaltenen ct-Werte eines housekeeping Gens (HRPT; Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase) zu den ct-Werten des zu untersuchenden Gens ins Verhältnis gesetzt, so dass man Aussagen über die jeweilige relative RNA-Menge machen kann. Das dimensionslose Ergebnis der Expression wurde nach folgender Formel berechnet. Dabei wurde angenommen, dass die Effizienz der beiden Primer gleich war und diese somit gleich eins gesetzt.

$$\text{RNA/HPRT} = (1 + \text{Effizienz})^{-(\text{ct-Wert Gen} - \text{ct-Wert HPRT})}$$

3.9.12 Zytokinmessung mittels Immulite

Die Zytokinmessung am Immulite (ein Chemilumineszenz-Immunoassay-System der Firma Siemens) beruht auf einem Sandwich-Prinzip ähnlich dem ELISA (Enzym-linked Immunsorbent Assay). Das System erlaubt die Messung verschiedener Parameter (z.B. Zytokine) innerhalb kurzer Zeit und weist eine sehr große Sensitivität und einen großen Messbereich auf.

Im Gegensatz zum ELISA verwendet das System des Immulite Polystyrolkugeln als Träger für die Zytokinspezifischen-Antikörper. Zum Nachweis des immobilisierten Zytokin wird alkalische Phosphatase, welche mit einem zytokinspezifischen Antikörper konjugiert ist, verwendet. Als Substrat wird AMPPD (Adamanthyldioethanphosphat) eingesetzt, welches durch die alkalische Phosphatase in ein instabiles Anionzwischenprodukt dephosphoryliert wird. Dieses setzt beim

Zerfall ein Photon frei, welches mittels Photomultiplier detektiert wird. Da ein Enzymmolekül viele Substratmoleküle umsetzen kann, wird das Signal verstärkt, so dass eine hohe Empfindlichkeit der Methode gegeben ist.

3.9.13 Statistik

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Ergebnisse als prozentualer Mittelwert mit jeweiliger Standardabweichung graphisch dargestellt. Die prozentualen Werte beziehen sich immer auf die jeweiligen Kontrollwerte. Für die statistische Auswertung wurden die Experimente 4-7-mal wiederholt. Verwendet wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Rangsummentest, bei dem zwei verbundene Stichproben auf einen signifikanten Unterschied in ihrer zentralen Tendenz hin untersucht werden. Signifikante Unterschiede, definiert als $p < 0,05$, wobei 'p' die Irrtumswahrscheinlichkeit angibt, wurden in den Graphiken jeweils mit (*) gekennzeichnet. Die Bedeutung der verwendeten Zeichen ist in der jeweiligen Legende erklärt.

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS.16 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 HO-1-Expression in humanen Monozyten

Zur Induktion der HO-1-Expression wurden frisch isolierte PBMCs mit dem HO-1 Induktor Cobalt-Protoporphyrin (CoPP) behandelt. Die verwendeten 30µM CoPP entsprachen dabei der höchstmöglichen, nicht toxischen Konzentration (Zellviabilität überprüft mittels Trypanblau-Färbung), bei der eine maximale HO-1-Induktion zu beobachten war. Nach der 15stündigen CoPP-Inkubation wurde ein Teil der Zellen für die spätere Western Blot Analyse lysiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die restlichen Zellen wurden mit Medium (RPMI komplett) gewaschen und weitere 12h bzw. 24h mit Medium (RPMI komplett) inkubiert. Bei der anschließenden Western Blot Analyse wurde die konstitutive HO-1-Proteinexpression mit der CoPP-induzierten HO-1-Proteinexpression verglichen.

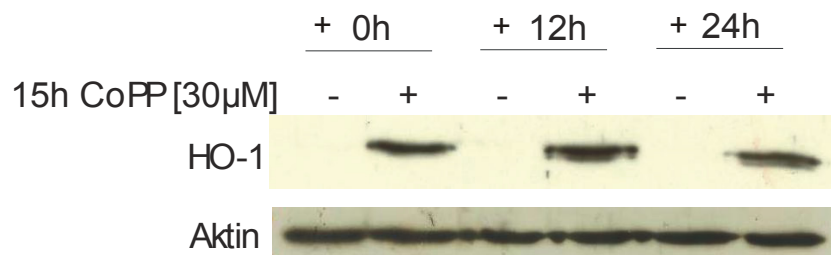


Abb. 14 CoPP-induzierte HO-1 Proteinexpression in humanen PBMCs

Frisch isolierte PBMCs wurden 15h mit 30µM CoPP vorinkubiert und gewaschen. Die Zellen wurden entweder direkt nach der CoPP-Behandlung (0h) oder nach weiteren 12h bzw. 24h Inkubation lysiert und mittels Western Blot analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten.

Die Proteinanalyse zeigt, dass PBMCs konstitutiv kein HO-1 exprimieren. Jedoch resultiert eine Präinkubation von PBMCs mit CoPP in einer Hochregulation der HO-1-Expression. Diese HO-1-Überexpression ist nach Entfernen des HO-1-Induktors für mindestens weitere 24h nachweisbar (Abb. 14).

Im nächsten Schritt wurden die in PBMCs enthaltenden einzelnen Zellpopulationen voneinander separiert und im Hinblick auf ihre HO-1-Expression untersucht. Monozyten, T-Zellen und B-Zellen wurden 15h mit 30µM CoPP inkubiert und anschließend die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert.

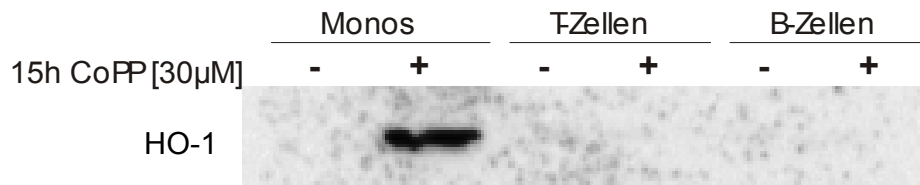


Abb. 15 CoPP-induzierte HO-1 Proteinexpression in verschiedenen Immunzellen

Monos = Monozyten; Die verschiedenen Leukozytensubpopulationen wurden 15h +/- 30µM CoPP inkubiert, lysiert und im Western Blot analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten.

Die Western Blot Analyse der einzelnen Zelltypen zeigt, dass in keiner der untersuchten Zellpopulationen eine konstitutive HO-1-Expression nachzuweisen ist. Durch eine Behandlung mit CoPP lässt sich die HO-1-Expression in Monozyten, nicht jedoch in Lymphozyten induzieren. Dies deutet darauf hin, dass HO-1-vermittelte Effekte hauptsächlich in Monozyten zu erwarten sind. Da gerade ein Funktionsverlust von Monozyten zu den wesentlichen Charakteristika einer Immundepression gehört, fokussierten sich die weiteren Untersuchung auf die Effekte einer Porphyrin-induzierten HO-1-Hochregulation auf die antigenpräsentierenden Eigenschaften von Monozyten.

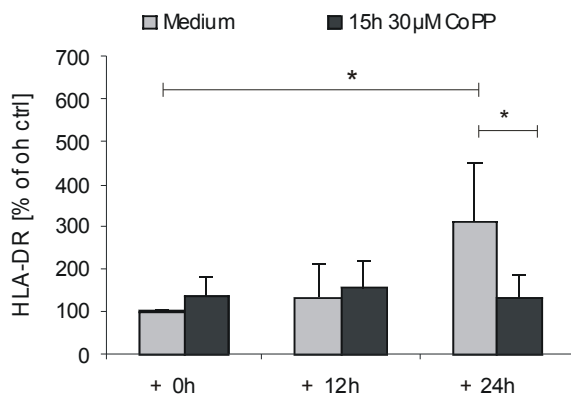
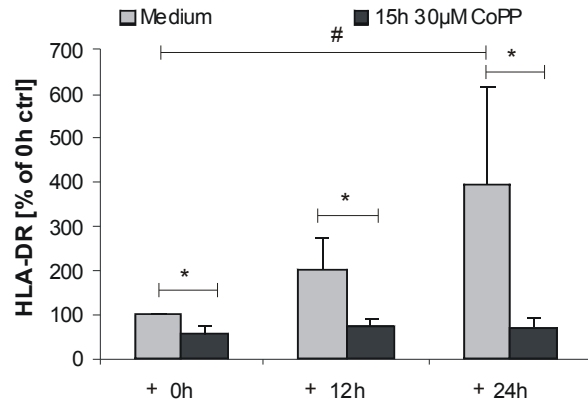
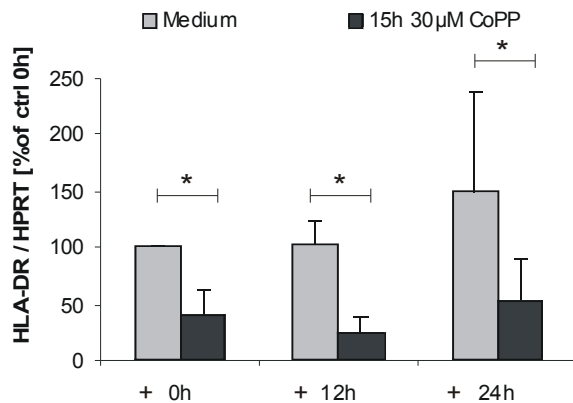
4.2 Effekte von HO-1-Induktoren auf den Phänotyp von humanen Monozyten

4.2.1 Beeinflussung der monozytären HLA-DR-Expression

Eine wesentliche funktionelle Eigenschaft von Monozyten ist die Präsentation von Antigenen mittels MHC-II Molekülen. Diese Fähigkeit ist bei einer Immundepression stark vermindert. Im nachfolgenden Versuch sollte deshalb untersucht werden, ob eine CoPP-induzierte HO-1-Hochregulation einen Einfluss auf die konstitutive HLA-DR-Expression in humanen Monozyten hat. Dabei wurde die Synthese von HLA-DR von der mRNA-Expression über die intrazelluläre bis zur oberflächlichen HLA-DR-Expression verfolgt.

Separierte Monozyten (für die mRNA-Analyse) bzw. PBMC (für die Analyse der intrazellulären und der oberflächlichen HLA-DR-Expression) wurden für 15h mit 30µM CoPP präinkubiert und anschließend die HLA-DR-Expression mittels Durchflusszytometrie (intrazelluläres und oberflächliches HLA-DR) oder RT-PCR (mRNA-Analyse) zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Die Ergebnisse der HLA-DR-Messung zeigen, dass es in kultivierten Monozyten zeitabhängig zu einer Hochregulation der HLA-DR Expression kommt. Dies zeigt sich sowohl auf der Zelloberfläche (Abb. 16A) als auch auf intrazellulärem Niveau (Abb. 16B). Auch die Expression der HLA-DR mRNA steigt zeitabhängig leicht an, allerdings erreicht sie im Vergleich zu den 0h-Werten kein signifikantes Niveau (Abb. 16C). Eine CoPP-Behandlung hemmt die konstitutive HLA-DR Expression. Bereits nach einer 15-stündigen CoPP-Vorbehandlung, während der es zu einer starken Induktion der HO-1 Expression kommt (siehe Abb. 14), ist die Expression der HLA-DR mRNA im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen signifikant gehemmt (Abb. 16C). Diese Suppression zeigt sich auch in einer signifikant verminderten Expression von intrazellulärem HLA-DR Protein (Abb. 16B). Die HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche (Abb. 16A) nimmt dagegen langsamer ab. In allen drei Fällen ist jedoch 24h nach CoPP-Behandlung die HLA-DR-Expression signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen gehemmt.

A - Oberflächen HLA-DR**B - intrazelluläres HLA-DR****C - HLA-DR mRNA****Abb. 16 HLA-DR Expression in Monozyten nach CoPP-induzierter HO-1 Hochregulation**

Die Zellen wurden 15h +/- 30µM CoPP inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend sofort analysiert (0h). Der andere Teil der Zellen wurde mit Medium gewaschen und weitere 12h bzw. 24h mit Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Expression der HLA-DR mRNA (A), der intrazellulären HLA-DR Expression (B) und die HLA-DR Expression auf der Oberfläche (C) analysiert. (A) Separierte Monozyten wurden zum angegebenen Zeitpunkt in entsprechendem RNA-Lysepuffer aufgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren. Die HLA-DR mRNA wurde mittels RT-PCR detektiert. (B) + (C) Die PBMCs wurden zum angegebenen Zeitpunkt mittels Durchflusszytometrie analysiert und die HLA-DR Expression der CD14-positiven Monozyten dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von vier bis fünf (außer +0h, +24h Oberflächen HLA-DR: n=28) unabhängigen Experimenten als prozentuale Abweichung von den unbehandelten Kontrollzellen zum Zeitpunkt t=0h. *= $p < 0,05$, #= $0,068$.

4.2.2 Einfluss von CoPP auf die MHC-II-Expression von B-Zellen und die MHC-I-Expression von Monozyten

Im folgenden Versuch wurden die MHC- und Zellspezifität der CoPP-vermittelten Effekte untersucht. Dazu wurde die Beeinflussung der MHC-I Expression von Monozyten und der HLA-DR Expression von B-Zellen analysiert.

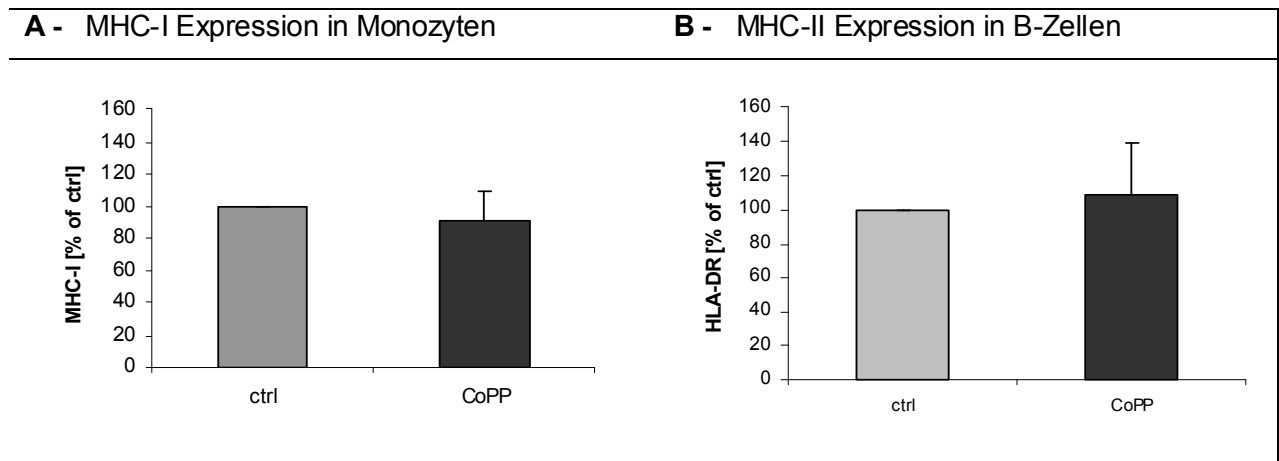


Abb. 17 MHC-I Expression auf Monozyten (A) und HLA-DR Expression auf B-Zellen (B) nach CoPP-induzierter HO-1 Hochregulation

PBMCs wurden 15h +/- 30µM CoPP behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und weitere 24h inkubiert. Die Analyse der Oberflächenproteine erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Detektiert wurde das MHC-I A1 Molekül auf CD14-positiven Monozyten und die HLA-DR Expression auf CD19-positiven B-Zellen. *Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten als prozentuale Abweichung von den unbehandelten Kontrollzellen.*

Weder die MHC-I-Expression auf Monozyten (Abb. 17A) noch die HLA-DR-Expression von B-Zellen (Abb. 17B) werden durch eine 15stündige CoPP Behandlung beeinflusst.

Folglich lässt dieses Ergebnis den Rückschluss zu, dass eine CoPP-Behandlung spezifisch die HLA-DR-Expression auf Monozyten beeinflusst, während sowohl die MHC-I-Expression auf Monozyten, als auch die MHC-II-Expression auf B-Zellen unbeeinflusst bleibt. Dies korreliert mit der CoPP-vermittelten selektiven HO-1-Hochregulation, welche ausschließlich in Monozyten jedoch nicht in B-Zellen zu beobachten ist (Abb. 15).

4.2.3 Genexpression der MHC-II-regulierenden costimulatorischen Moleküle nach CoPP-induzierter HO-1 Hochregulation

Um die Auswirkung einer CoPP-induzierten HO-1-Überexpression auf die MHC-II-Expression von Monozyten genauer zu untersuchen, wurden im Folgenden weitere Moleküle analysiert, welche für eine optimale Antigenbeladung der MHC-II Moleküle wichtig sind. Insbesondere interessierte die Genexpression von CD86, der Cystein-Protease Cathepsin S, sowie die Expression von CD74 (invariant chain) und HLA-DM. Während CD74 das neu synthetisierte HLA-DR-Molekül stabilisiert und zudem als CLIP-Protein die leere Bindetasche des MHC-II Moleküls blockiert, katalysiert HLA-DM den Austausch von CLIP gegen das zu präsentierende Antigen.

Für die Analyse wurden separierte Monozyten 15h mit 30µM CoPP vorbehandelt und die mRNA Expression der verschiedenen Moleküle zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels RT-PCR detektiert.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigen, dass eine Induktion von HO-1 mit einer signifikant verminderten Expression von CD74 (Abb. 18A) und HLA-DMA (Abb. 18B) assoziiert ist. Diese Suppression ist bis zu 24h nach Entfernen des HO-1-Induktors signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu bleibt die konstitutive Expression des Comoleküls CD86 unbeeinflusst von der HO-1-Induktion (Abb. 18C), auch wenn 24h nach der CoPP-Behandlung die CD86-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen tendenziell leicht vermindert scheint. Die mRNA-Expression der Protease Cathepsin S ist direkt nach der CoPP-Behandlung vermindert, steigt jedoch nach Entfernen des HO-1-Induktors innerhalb von 24h wieder auf Kontrollniveau an (Abb. 18D).

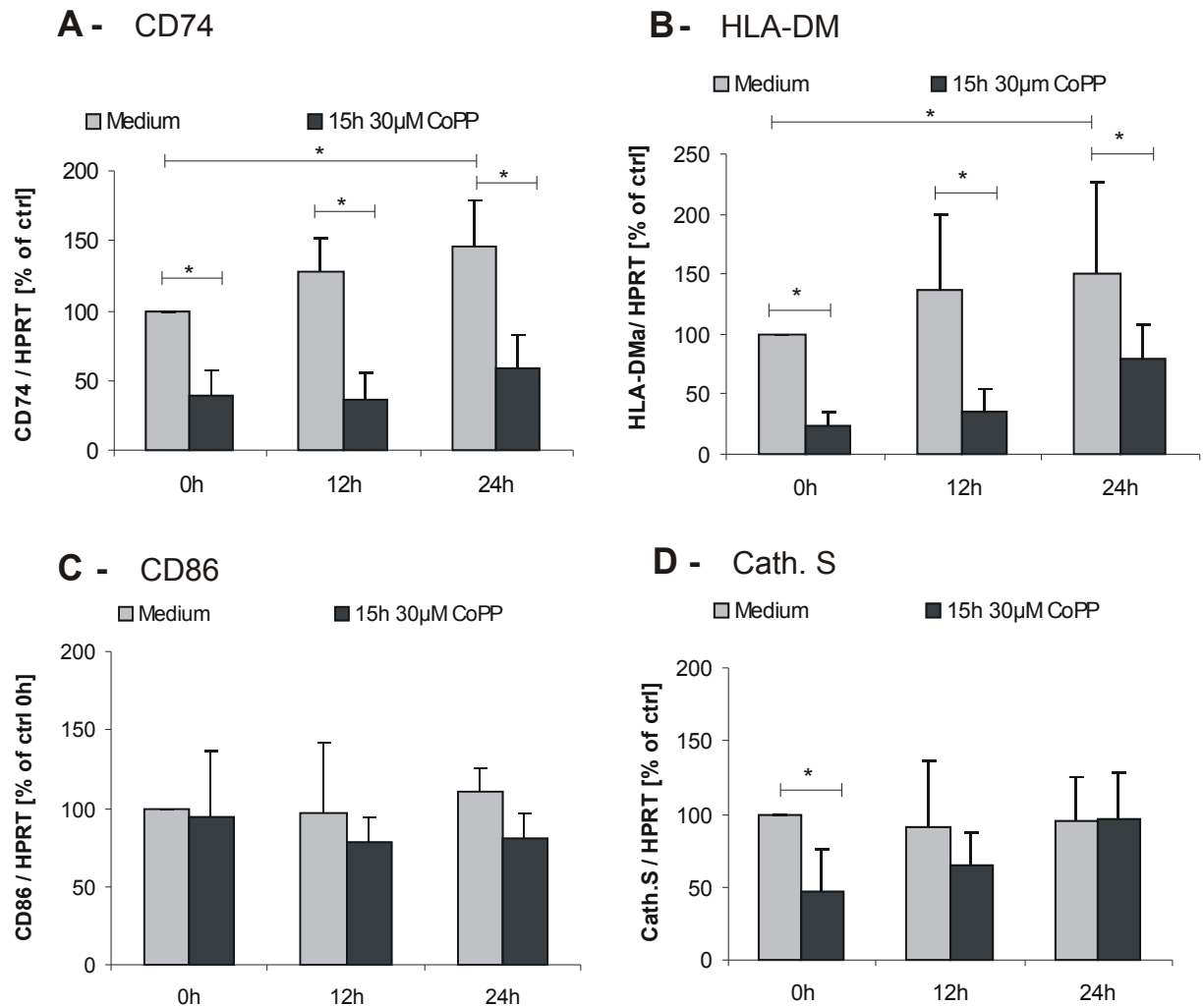


Abb. 18 Genexpression von CD74 (A), HLA-DM (B), CD86 (C) und Cathepsin S (D) nach CoPP-induzierter HO-1 Hochregulation

*Separierte Monozyten wurden 15h +/- 30µM CoPP inkubiert, mit Medium gewaschen und entweder sofort nach der Präinkubation oder nach weiteren 12h bzw. 24h Inkubation in entsprechendem RNA-Lysepuffer lysiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren. Mittels RT-PCR wurde die Genexpression von CD74 (A), HLA-DMA (B), CD86 (C) und Cathepsin S (D) analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten als prozentuale Abweichung von den unbehandelten Kontrollzellen zum Zeitpunkt t=0h. *= $p < 0,05$.*

Die Analyse der Genexpression der vier Moleküle zeigt, dass hauptsächlich die Expression von Proteinen, welche unter der Kontrolle des MHC-II-Masterregulators Klasse-II-Transaktivator (CIITA) stehen, in CoPP-behandelten Monozyten beeinträchtigt sind. Zu diesen Proteinen gehören sowohl HLA-DR als auch CD74 und HLA-DM. Eine Hemmung dieser Proteine kann auf eine Suppression der CIITA-Expression hindeuten. Die Ergebnisse führten also zu der Vermutung, dass eine Porphyrin-Behandlung die Expression oder Funktionalität des MHC-II Masterregulators beeinflusst.

4.2.4 Beeinflussung der konstitutiven CIITA-Expression

Für die Analyse der CIITA-Genexpression wurden separierte Monozyten 15h mit 30µM CoPP behandelt und die CIITA Expression zu verschiedenen Zeitpunkten mittels RT-PCR untersucht.

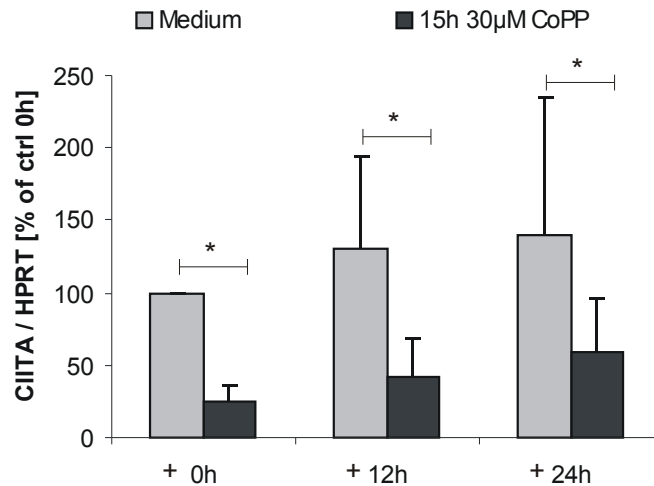


Abb. 19 CIITA mRNA Expression nach CoPP-induzierter HO-1 Hochregulation

*Separierte Monozyten wurden 15h +/- 30µM CoPP inkubiert und anschließend mit Medium gewaschen. Sofort nach der Präinkubation oder nach weiteren 12h bzw. 24h Inkubation wurden die Zellen lysiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren. Die CIITA Genexpression wurde mittels RT-PCR analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten, als prozentuale Abweichung von den unbehandelten Kontrollzellen zum Zeitpunkt t=0h. *= $p < 0,05$.*

Das Ergebnis zeigt, dass eine HO-1-Induktion in Monozyten mit einer signifikant verminderten konstitutiven Expression von CIITA korreliert. Diese Hemmung ist bis zu 24h nach Entfernen des HO-1-Induktors signifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 19).

Das hier gezeigte Ergebnis korreliert zudem mit der unter Kapitel 4.2.3 gezeigten verminderten Expression von HLA-DR (Abb. 16), CD74 und HLA-DM (Abb. 18). Die Hemmung der CIITA-Expression durch eine CoPP-Behandlung könnte demzufolge die verminderte Expression von HLA-DR, CD74 und HLA-DM erklären.

4.2.5 Einfluss einer CoPP-Behandlung auf die IFN- γ -induzierte MHC-II-Expression

Die Expression von CIITA wird durch das proinflammatorische Zytokin IFN- γ stark induziert. Eine gesteigerte CIITA-Expression führt wiederum zu einer gesteigerten HLA-DR Expression. Eigene Vorarbeiten zeigten, dass eine CoPP-Präinkubation die IFN- γ -induzierte Oberflächenexpression von HLA-DR signifikant vermindert [48,73]. Um diese Daten zu bestätigen, wurde in der

folgenden Versuchsreihe die Beeinflussung der IFN- γ -induzierten monozytären HLA-DR- (Abb.20B) und CIITA- (Abb.20C) Expression durch eine CoPP-Vorbehandlung untersucht.

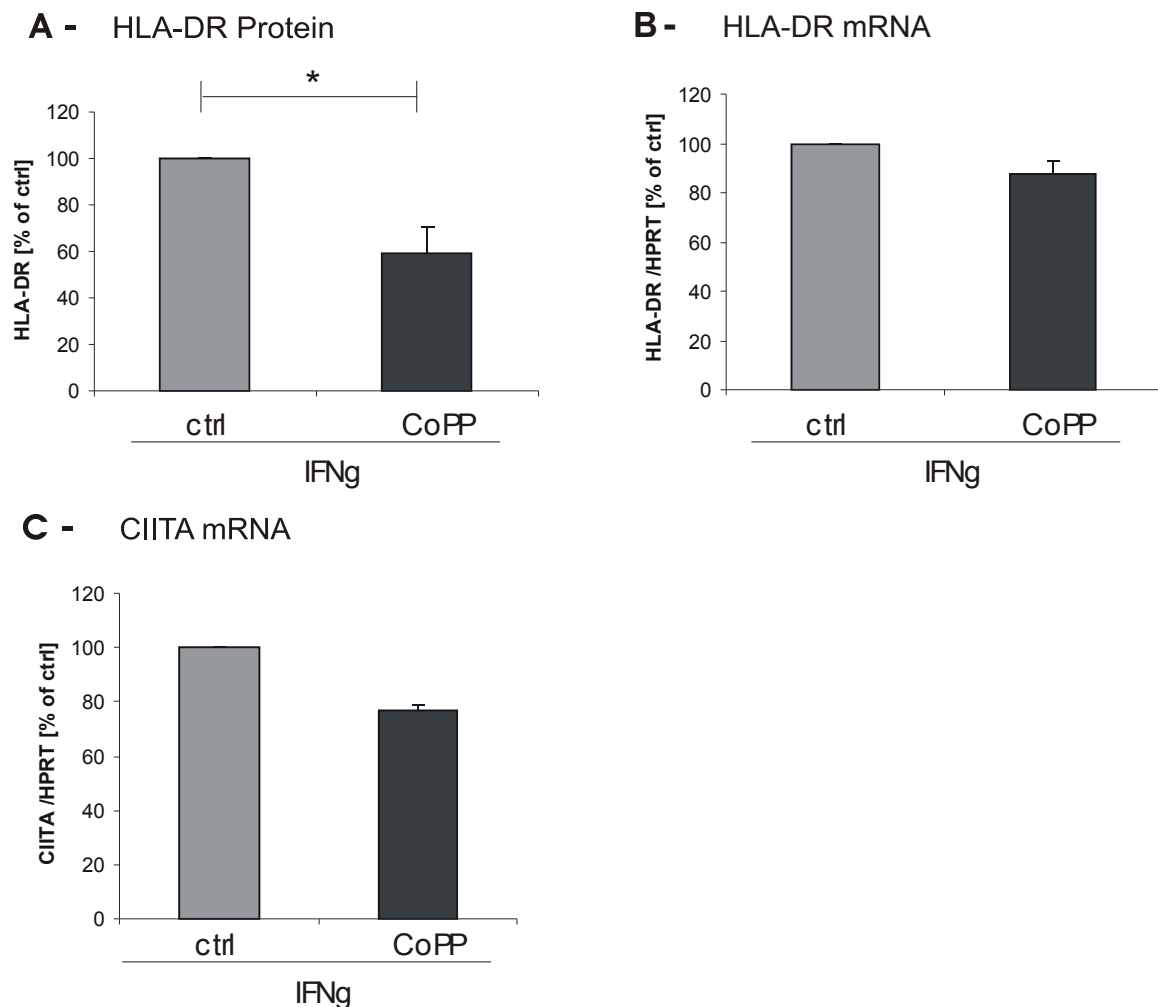


Abb. 20 Beeinflussung der IFN- γ -induzierten HLA-DR und CIITA Expression durch CoPP

(A) PBMCs wurden 15h +/- 30 μ M CoPP inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 24h mit 10ng/ml IFN- γ stimuliert. Nach der Inkubation wurde die Oberflächenexpression von HLA-DR auf CD14-positiven Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten als prozentuale Abweichung von den Kontrollzellen. $*=p<0,05$. (B) und (C) Separierte Monozyten wurden 15h +/- 30 μ M CoPP inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 24h mit 10ng/ml IFN- γ stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit entsprechendem Lysepuffer lysiert und die HLA-DR- und CIITA- Genexpression mittels RT-PCR analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten als prozentuale Abweichung von den Kontrollzellen

Eine CoPP-Vorbehandlung hemmt signifikant die IFN- γ -induzierte HLA-DR-Expression auf der Oberfläche von Monozyten (Abb.20A). Die Analyse der HLA-DR-mRNA zeigt jedoch nur eine leichte Verminderung der IFN- γ -induzierten Expression (Abb.20B), während die CIITA Genexpression durch eine CoPP-Vorbehandlung um ca 20% reduziert ist. Auf Grund der Resultate der HLA-DR Proteinexpression, wo eine signifikante Hemmung der IFN- γ -induzierten HLA-DR Oberflächenexpression um ca. 40% in Folge einer CoPP-Präinkubation zu detektieren war, und der eindeutig verminderten CIITA mRNA-Expression, wurde ebenfalls eine stärkere Hemmung der HLA-DR mRNA-Expression erwartet. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise mit Probanden-spezifischen Unterschieden erklären, da die Zellen für die Oberflächenanalyse in diesem Fall nicht von den gleichen Probanden stammten, wie die Zellen für die mRNA-Analyse. Eine weitere Überlegung ist, dass die IFN- γ -induzierte HLA-DR-Hochregulation durch CoPP, im Gegensatz zur konstitutiven HLA-DR-Expression, eventuell erst posttranskriptional beeinflusst wird.

4.3 Nachweis der HO-1-Spezifität

Die bisherigen Versuche wurden unter der Annahme durchgeführt, dass die Porphyrin-induzierte Überexpression von HO-1 Ursache für die Hemmung der HLA-DR-Expression ist. Wenn sich diese Hypothese bestätigt, sollten andere HO-1-Induktoren, wie z.B. Hämin, ähnliche Effekte haben und zudem sollte eine Hemmung von HO-1 die supprimierende Wirkung von CoPP aufheben.

4.3.1 HO-1-Proteinexpression im Vergleich nach CoPP- und Hämin-Behandlung

Zunächst wurde die HO-1-Induktion durch CoPP und Hämin verglichen. Dazu wurden PBMCs 15h mit 30 μ M CoPP bzw. mit 30 μ M Hämin vorbehandelt und anschließend die HO-1-Proteinexpression zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Western Blot analysiert.

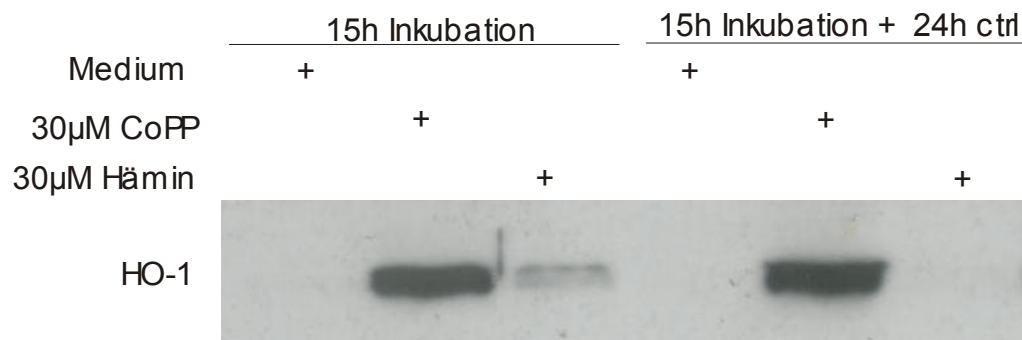


Abb. 21 HO-1-Expression in humanen PBMCs nach Porphyrin-Behandlung

*Frisch isolierte PBMCs wurden 15h +/- 30 μ M CoPP bzw. +/- 30 μ M Hämin inkubiert und anschließend mit Medium gewaschen. Für die Analyse wurden die Zellen entweder sofort nach der Präinkubation oder nach weiteren 24h Inkubation mit entsprechendem Western Blot-Lysepuffer lysiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren. Die HO-1-Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert. **Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten.***

Die HO-1-Proteinanalyse bestätigte zum einen, dass konstitutiv keine HO-1-Expression nachzuweisen ist, und zum anderen, dass eine 15-stündige CoPP-Behandlung zu einer starken HO-1-Hochregulation führt, welche bis zu 24h nach Entfernen von CoPP sehr gut zu detektieren ist. Eine Behandlung mit Hämin resultiert dagegen in einer schwächeren HO-1-Expression nach 15h Inkubationszeit, welche 24h nach Entfernen von Hämin jedoch nicht mehr detektierbar war (Abb. 21).

4.3.2 Kinetik der HO-1-Expression in Monozyten nach CoPP- und Hämin-Behandlung

Um die Unterschiede in der durch CoPP und Hämin induzierten HO-1-Expression genauer zu analysieren, wurde die Proteinexpression nach 1h, 4h und 8h analysiert.

Da die HO-1 hauptsächlich in Monozyten induzierbar ist, wurden für die Kinetik diese Zellen aus den PBMCs isoliert, mit 30µM CoPP und 30µM Hämin inkubiert und anschließend sowohl die HO-1 Proteinexpression (Abb. 22) als auch der HO-1 mRNA-Level (Abb.) analysiert.

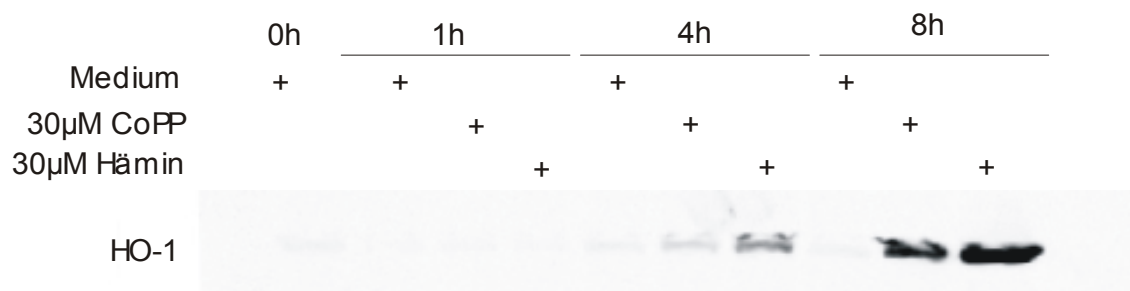


Abb. 22 Kinetik der HO-1 Proteinexpression in humanen Monozyten nach Porphyrinbehandlung

Separierte Monozyten wurden über den angegebenen Zeitraum +/- 30µM CoPP bzw. +/- 30µM Hämin inkubiert, anschließend lysiert und die HO-1 Proteinexpression im Western Blot analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten.

Die Kinetik zeigt, dass Hämin schneller zu einer nachweisbaren Induktion von HO-1 führt als CoPP. Schon 4h nach der Behandlung mit Hämin ist HO-1 gut detektierbar, während die durch CoPP-induzierte HO-1-Expression marginal ist. Nach 8h wird durch beide Porphyrine eine gut nachweisbare HO-1-Proteinmenge induziert, wobei auf Grund der Bandenstärke quantitativ mehr HO-1 nach Hämin-Behandlung als nach CoPP-Behandlung produziert wurde. Die Hämin-vermittelte Induktion von HO-1 nimmt jedoch 15h nach der Behandlung wieder stark ab, während CoPP zu einer längeren HO-1-Induktion führt (Abb. 21).

Durch eine HO-1-mRNA-Analyse soll im nächsten Schritt ein genaueres Verständnis über die Kinetik der CoPP- und Hämin-induzierten HO-1-Expression erlangt werden.

Dazu wurden separierte Monozyten über den angegebenen Zeitraum mit 30µM CoPP bzw. 30µM Hämin inkubiert und die HO-1-Genexpression nach verschiedenen Zeitpunkten mittels RT-PCR analysiert.

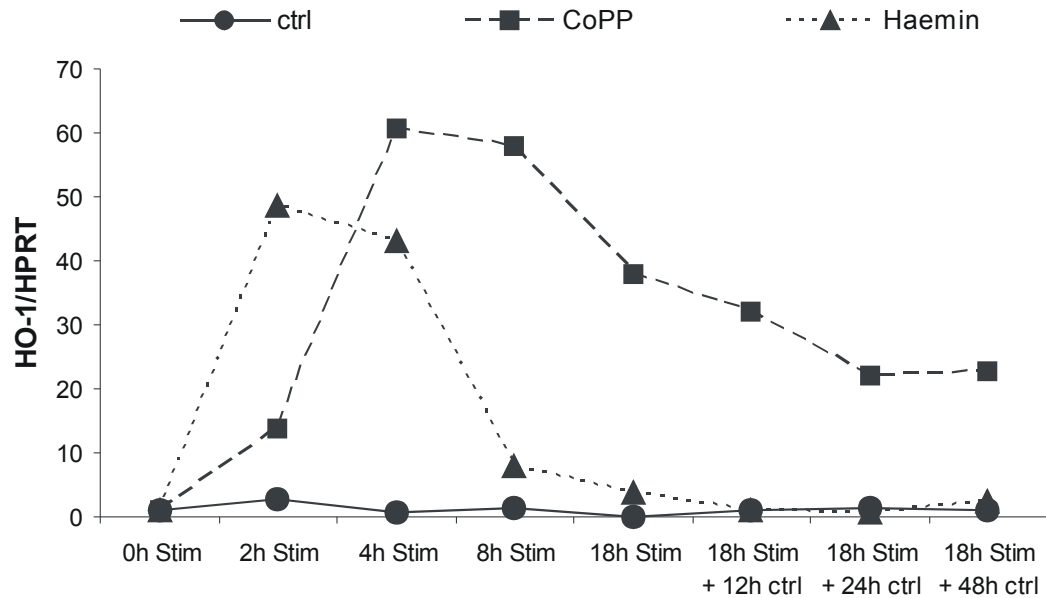


Abb. 23 Kinetik der HO-1 Genexpression in humanen Monozyten nach CoPP- und Hämin-Behandlung

Separierte Monozyten wurden für 2h, 4h, 8h und 18h +/- 30µM CoPP bzw. +/- 30µM Hämin stimuliert. Nach 18h Stimulation wurde ein Teil der Zellen gewaschen und für weitere 12h, 24h bzw. 48h mit Medium inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die jeweiligen Zellen mit speziellem RNA-Lysepuffer lysiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren. Die HO-1 Genexpression wurde mittels RT-PCR analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der mRNA-Expression ergab, dass Monozyten konstitutiv nur wenig HO-1 mRNA exprimieren. Während einer Behandlung mit 30µM CoPP und 30µM Hämin steigt die HO-1 mRNA-Expression jedoch stark an. Allerdings zeigt sich eine verschobene Kinetik im Vergleich von CoPP- und Hämin-induzierter HO-1-Expression. Während es durch Hämin zu einer sehr schnellen HO-1 Induktion kommt, die bereits nach 2h Inkubation ihr Maximum erreicht und nach 18h wieder auf Kontrollniveau abgesunken ist, steigt die CoPP-induzierte HO-1-Expression langsamer an und erreicht erst nach 4h Inkubation ihr Maximum. Nach 8h nimmt auch die CoPP-induzierte HO-1-Expression langsam wieder ab, bleibt jedoch auch 48h nach Entfernen des Induktors deutlich über dem Niveau der unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 23).

Sowohl die RNA-Analyse, als auch die Proteinanalyse (Abb. 21 und Abb. 22) zeigen, dass beide Porphyrine die Expression von HO-1 induzieren.

4.3.3 Einfluss von Hämin auf die monozytäre HLA-DR-Expression

Die oben dargestellten Daten zeigten eine langanhaltendere Induktion der HO-1-Expression durch das synthetische Protoporphyrin CoPP im Vergleich zu Hämin. Unter der Annahme, dass die verminderte HLA-DR-Expression von der induzierten HO-1-Expression abhängt, sollte die in Folge einer CoPP-Behandlung beobachtete Hemmung der HLA-DR-Expression ebenfalls stärker ausfallen als nach Hämin-Behandlung.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde die monozytäre HLA-DR-Expression in CoPP- bzw. Hämin-behandelten PBMCs verglichen.

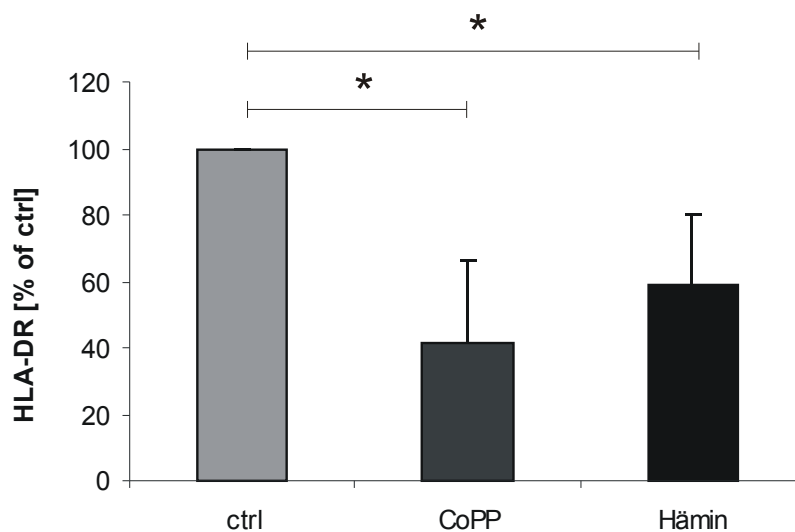


Abb. 24 HLA-DR-Expression von Monozyten nach Porphyrinbehandlung

Die Zellen wurden 15h +/- 30µM CoPP bzw. +/- 30µM Hämin inkubiert, anschließend mit Medium gewaschen und für weitere 24h inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die HLA-DR Expression der CD14+ Monozyten analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 28 (CoPP-Behandlung) bzw. 8 (Hämin-Behandlung) unabhängigen Experimenten als prozentuale Abweichung von den unbehandelten Kontrollzellen. $*=p<0,01$

24h nach Präinkubation zeigte sich sowohl in CoPP- als auch in Hämin-behandelten Monozyten eine signifikant Hemmung der konstitutiven HLA-DR-Expression. Die im Vergleich zu Hämin-behandelten Zellen tendentiell stärkere HLA-DR-Hemmung nach CoPP-Präinkubation ist möglicherweise auf die stärker HO-1-Induktion durch CoPP zurück zu führen (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2).

4.3.4 Hemmung der HO-1-Expression mittels siRNA

Im nächsten Schritt sollte mittels spezifischer Hemmung der HO-1-mRNA gezeigt werden, dass die beobachteten Porphyrin-Effekte tatsächlich HO-1-abhängig sind. In diesem Fall sollte eine Hemmung der HO-1-Induktion mittels spezifischer siRNA die CoPP- und Hämin-vermittelten Effekte aufheben.

Zunächst wurde die Effizienz der HO-1-spezifischen siRNA hinsichtlich ihrer Hemmung der HO-1-Expression untersucht. Dazu wurden Monozyten mit HO-1-spezifischer siRNA, unspezifischer Kontroll-siRNA oder ohne jegliche siRNA transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend 15h mit 30µM CoPP behandelt und danach die HO-1-Proteinexpression mittels Western Blot analysiert.

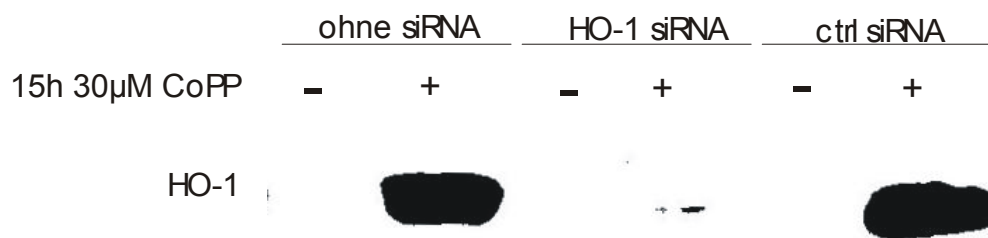


Abb. 25 HO-1 Proteinexpression von Monozyten nach Transfektion von siRNA

Separierte Monozyten wurden mit HO-1-spezifischer siRNA bzw. mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend für 15h +/- 30µM CoPP inkubiert. Die HO-1- Proteinexpression wurde mittels Western Blot detektiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten

Es zeigte sich, dass die Transfektion alleine keinen Effekt auf die Expression des Hitzeschockproteins (HO-1) hat. Eine CoPP-Behandlung führt jedoch sowohl in den ohne siRNA transfizierten Monozyten als auch in den mit der unspezifischen siRNA transfizierten Zellen zu einer massiven HO-1-Proteinexpression. Nach Transfektion mit HO-1-spezifischer siRNA ist die CoPP-induzierte HO-1-Expression jedoch nahezu vollständig gehemmt.

Die Proteinanalyse der transfizierten Zellen zeigte demnach eine optimale Hemmung der HO-1-Expression nach Transfektion mit HO-1-spezifischer siRNA.

Wenn die CoPP- und Hämin-vermittelten Effekte ausschließlich HO-1-abhängig sind, sollte eine Hemmung der HO-1-Expression die Inhibition der HLA-DR-Expression aufheben.

Zur Untersuchung dieser Annahme wurde daher die HLA-DR-Expression in siRNA-transfizierten Monozyten nach 24h nach CoPP- bzw. Hämin-Präinkubation (15h mit 30µM CoPP bzw. 30µM Hämin) mittels Durchflusszytometrie analysiert.

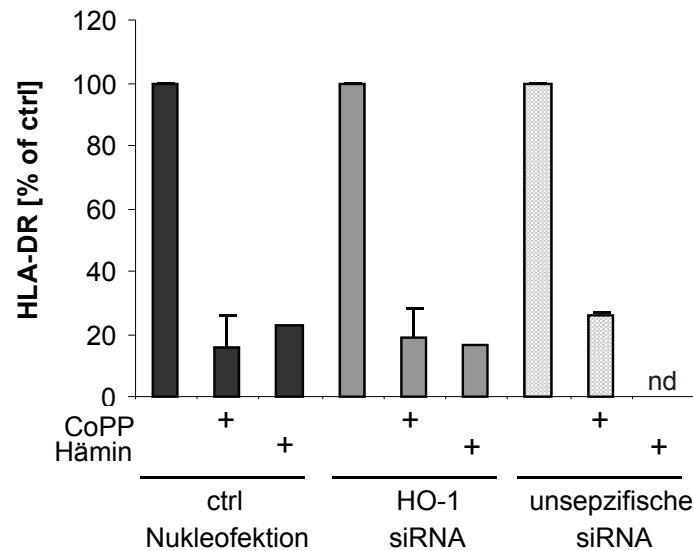


Abb. 26 HLA-DR-Expression nach Hemmung der HO-1-Expression mittels siRNA

Separierte Monozyten wurden mit HO-1 spezifischer siRNA bzw. mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert, 2h ruhen gelassen und dann 15h +/- 30µM CoPP bzw. +/- 30µM Hämin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und weitere 24h inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde dann die HLA-DR-Expression analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 (CoPP-Behandlung) bzw. die Werte von einem (Hämin-Behandlung) unabhängigen Experiment(en) als prozentualer Wert der Kontrollzellen.

Die Analyse der HLA-DR-Expression zeigt, dass die Suppression der HO-1-Expression nicht die CoPP- bzw. Hämin-vermittelte Hemmung der MHC-II-Expression aufheben kann (Abb. 26), woraus geschlossen wurde, dass die verwendeten Porphyrine CoPP und Hämin die monozytäre HLA-DR-Expression über HO-1-unabhängige Mechanismen hemmen.

4.4 Rolle des Hämoglobin-Scavenger Rezeptors in der Porphyrin-vermittelten Hemmung der HLA-DR-Expression

Die strukturelle Ähnlichkeit der verwendeten Protoporphyrine CoPP und Hämin mit dem natürlichen Substrat der HO-1, dem Hämprotein, führte zu der Annahme, dass die drei Moleküle über den selben Mechanismus in die Zelle gelangen und damit auch eine ähnliche Wirkung auf die Zielzelle haben. Die Aufnahme des aus vier Hämproteinen aufgebauten Hämoglobins wird über den Hämoglobin-Scavenger Rezeptor CD163 initiiert. Unter Berücksichtigung der oben aufgestellten Hypothese sollte eine Behandlung der Zellen mit Hämoglobin (Hb) bzw. Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen (HbHg), ähnlich wie CoPP und Hämin, zu einer Hemmung der konstitutiven HLA-DR-Expression führen. Sofern die Effekte CD163-abhängig sind, sollte zudem ein Blockieren des Hämoglobin-scavenger Rezeptors mittels spezifischer Antikörper die Porphyrin-vermittelte HLA-DR-Hemmung aufheben.

4.4.1 Einfluss einer HbHg-Behandlung auf die konstitutive HLA-DR-Expression in Monozyten

Zunächst wurde kontrolliert, ob in humanen Monozyten eine konstitutive CD163-Expression zu detektieren ist. Dazu wurden frisch isolierte PBMC in Kultur genommen und die CD163-Expression der Monozyten direkt nach Präparation, sowie nach weiteren 15h bzw. 40h Inkubation detektiert.

Zudem wurde die Beeinflussung der monozytären HLA-DR-Expression durch eine Hb- bzw. HbHg-Behandlung untersucht. Für die Analyse der MHC-II-Expression wurden die Zellen 15h mit CoPP, Hämin und HbHg inkubiert, gewaschen, weitere 24h inkubiert und anschließend die HLA-DR-Expression der Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert.

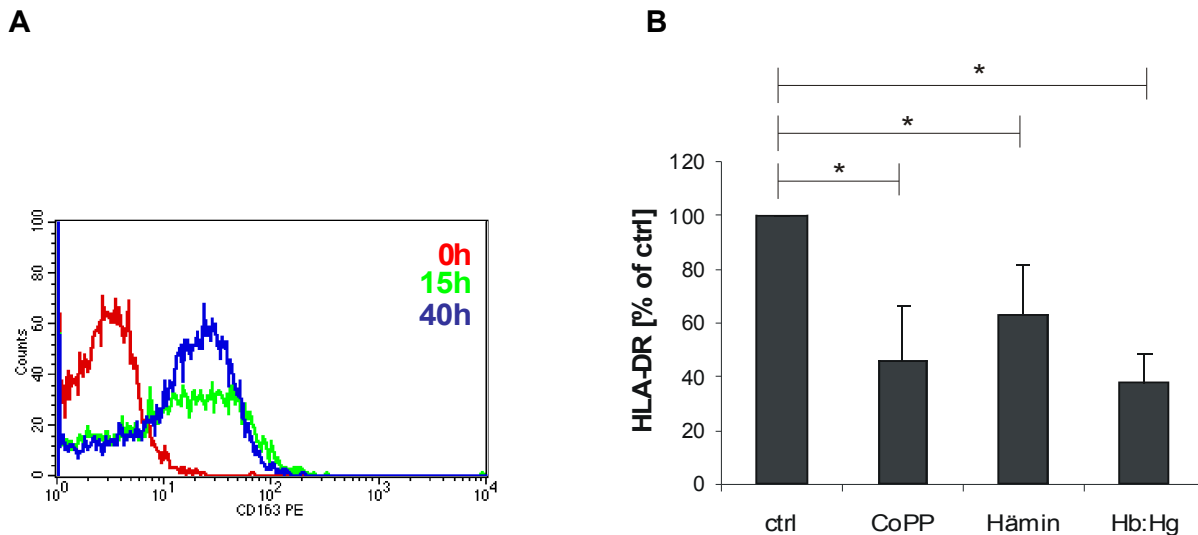


Abb. 27 Konstitutive Expression von CD163 (A) und HLA-DR (B) auf Monozyten nach Porphyrin-Behandlung

(A) Die CD163-Expression der CD14-positive Monozyten wurde direkt nach PBMC-Präparation (0h), sowie 15h und 40h nach der Präparation mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten. (B) PBMCs wurden 15h mit 30 μ M CoPP, 30 μ M Hämin und 1mg/ml HbHg stimuliert, anschließend mit Medium gewaschen und weitere 24h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die HLA-DR Expression der CD14-positiven Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 11 unabhängigen Experimenten als prozentualer Wert der unbehandelten Kontrollzellen. *= $p < 0,05$

Das Ergebnis der CD163-Messung bestätigt die Literaturdaten [122] und zeigt, dass kultivierte genomene Monozyten ihre CD163-Expression hoch regulieren (Abb. 27A).

Eine Präinkubation mit HbHg-Komplexen resultiert zudem ebenso wie für Porphyrine gezeigt in einer signifikanten Hemmung der konstitutiven MHC-II-Expression (Abb. 27B). Gleiche Hemmeffekte auf die HLA-DR-Expression wie für HbHg-Komplexe wurden ebenfalls für eine Präinkubation mit Hämoglobin alleine beobachtet (Daten nicht gezeigt, siehe auch 7.4.3).

Die Bindung von HbHg-Komplexen an den Hämoglobin-Scavenger Rezeptor induziert die Synthese des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 [87], welches in der Lage ist, die HLA-DR-Expression in Monozyten und Makrophagen zu inhibieren [123].

Im nächsten Versuch sollte daher geklärt werden, ob die Protoporphyrin-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression IL-10 abhängig ist.

4.4.2 Einfluss von IL-10 auf die Porphyrin-Effekte

Zunächst wurde die IL-10-Konzentration im Kulturüberstand nach einer 15stündigen Präinkubation von PBMC mit CoPP, Hämin und HbHg gemessen. Anschließend wurde die Wirkung des Zytokins durch einen IL-10-neutralisierenden Antikörper (anti IL-10) blockiert und die Effekte einer Porphyrin-Behandlung auf die monozytäre HLA-DR-Expression mit und ohne anti-IL-10 Antikörper mittels Durchflusszytometrie verglichen.

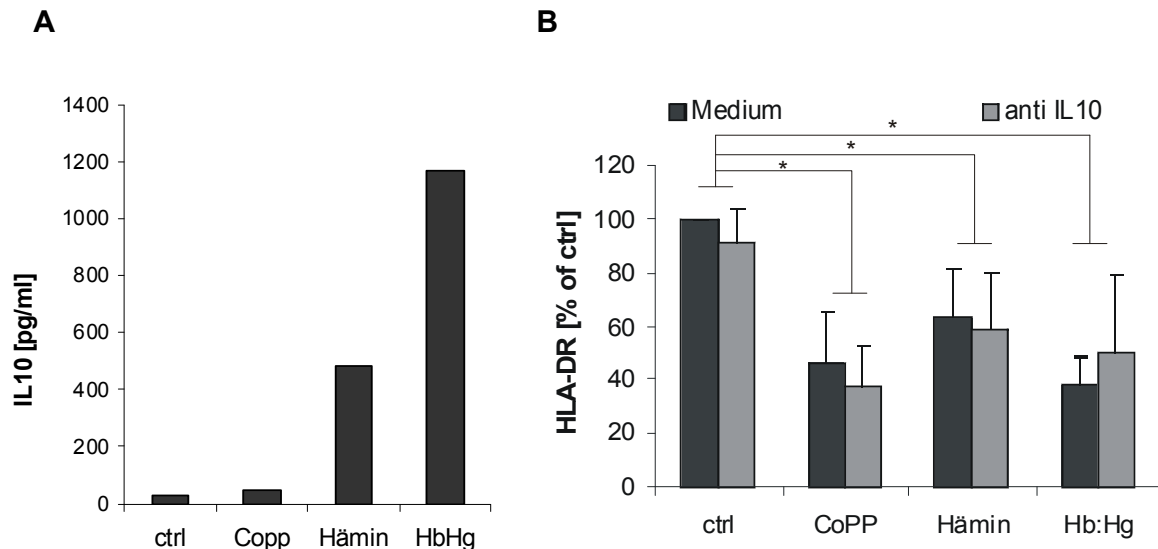


Abb. 28 IL-10-Expression (A) und HLA-DR-Expression nach Neutralisierung von IL-10 (B) nach Behandlung mit CoPP, Hämin und HbHg

(A) PBMCs wurden 15h mit 30µM CoPP, 30µM Hämin und 1mg/ml HbHg-Komplexen inkubiert und anschließend die IL-10 Konzentration im Überstand am Immulite gemessen. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von zwei unabhängigen Experimenten. (B) PBMCs wurden 15h mit 10µg/ml anti IL-10 und mit 30µM CoPP, 30µM Hämin und 1mg/ml HbHg-Komplexen stimuliert. Anschließend wurden Zellen mit Medium (RPMI komplett) gewaschen, weitere 24h inkubiert und nach der Inkubation die HLA-DR Expression der CD14-positiven Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten als prozentualer Wert der unbehandelten Kontrollzellen. $*=p<0,05$

Das Ergebnis der IL-10 Messung zeigt, dass Monozyten sowohl konstitutiv als auch nach CoPP-Behandlung kaum IL-10 produzieren. Im Gegensatz dazu induziert eine Behandlung mit Hämin und HbHg die Synthese von IL-10, so dass große Mengen des antiinflammatorischen Zytokins im Überstand zu detektiert sind (Abb. 28A). Die Abb. 28 B zeigt jedoch, dass die gesteigerte IL-10-Produktion nicht für die Porphyrin-induzierte Hemmung der HLA-DR-Expression verantwortlich ist, da eine Neutralisation von IL-10 den hemmenden Effekt von Hämin und HbHg nicht aufheben

kann (Abb. 28B). Für eine Unabhängigkeit von IL-10 spricht zudem, dass eine CoPP-Behandlung kein IL-10 induziert, aber dennoch zu einer signifikanten Hemmung der HLA-DR-Expression führt.

4.4.3 Beeinflussung der Porphyrin-Effekte durch Blockieren von CD163 (Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor)

Die bisherigen Befunde zeigten, dass eine Behandlung sowohl mit den Porphyrinen CoPP und Hämin, als auch mit Hb und HbHg-Komplexen zu einer Hemmung der monozytären HLA-DR-Expression führt. Dies und die strukturelle Ähnlichkeit der verwendeten Porphyrine lässt die Hypothese zu, dass die vermittelten Effekte durch einen CD163-abhängigen Mechanismus initiiert werden. Daher sollte durch Blockieren des Hämoglobin-Scavenger Rezeptors die Porphyrin- bzw. Hb/Hg-induzierten Effekte aufgehoben werden.

Zum Blockieren des Rezeptors wurde der CD163-spezifische Antikörperklon EDHu-1 verwendet. Dieser bindet an die SRCR Domäne 3 des Rezeptors und blockiert somit die Bindung von HbHg an CD163 [124] .

Erste Austestungen von EDHu-1 ergaben jedoch, dass der Antikörper Endotoxin-kontaminiert war (EDHu-1: 263pg Endotoxin/ml), so dass dieser zunächst mittels EndoTrap-Red-System aufgereinigt werden musste.

Der aufgereinigte, endotoxinfreie Antikörperklon EDHu-1 (Frak.2A) wurde dann zum Blockieren des Hämoglobin-Scavenger Rezeptors verwendet. Die eingesetzten EDHu-1-Konzentrationen ergaben sich aus einer veröffentlichten Studie, bei der die HbHg-induzierte IL-10-Synthese in humanen Monozyten mit einem CD163-Antikörper (Klon RM3/1) gehemmt werden konnte [87] . Der Antikörperklon RM3/1 wurde in dieser Arbeit jedoch auf Grund seiner sehr starken Endotoxinkontamination (RM3/1: 20ng Endotoxin/ml) nicht verwendet.

Vorversuche zeigten, dass auch Hämoglobin (Hb) alleine die konstitutive Expression von HLA-DR vermindert (siehe 7.4.1). Für den Versuch wurden PBMCs 30min mit 10ng/ml – 50ng/ml Frak.2A (Endotoxin-freier EDHu-1) vorbehandelt, bevor sie zusätzlich 15h mit 1mg/ml Hb inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen weitere 24h mit Medium inkubiert und die HLA-DR-Expression der Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert.

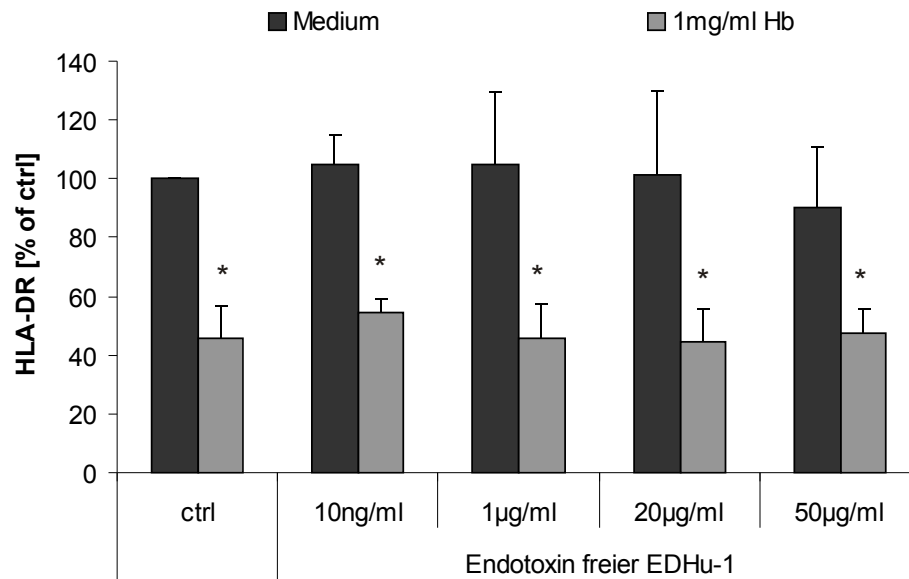


Abb. 29 HLA-DR-Expression nach Blockieren von CD163

PBMCs wurden 30min mit 10ng/ml, 1µg/ml, 20mg/ml und 50µg/ml Frak.2A (Endotoxin-freier EDHu-1) vorinkubiert und dann für weitere 15h zusätzlich +/- 1mg/ml Hb stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium (RPMI komplett) gewaschen und weitere 24h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die HLA-DR-Expression der CD14-positiven Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 9 unabhängigen Experimenten als prozentualer Wert der unbehandelten Kontrollzellen. $*=p<0,05$.

Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass der endotoxinfreie Antikörperklon EDHu-1 die konstitutive HLA-DR-Expression nicht beeinflusst und zum anderen, dass eine Stimulation mit Hämoglobin (Hb) signifikant die Expression von HLA-DR hemmt. Allerdings kann ein Blockieren des Hämoglobin-Scavenger Rezeptors mittels EDHu-1 den hemmenden Effekt von Hb nicht aufheben. Ein Blockieren der SRCR Domäne 3 von CD163 durch EDHu-1 hob zudem nicht die Hb-induzierte IL-10 Expression auf (Daten nicht gezeigt). Dies kann darauf hindeuten, dass die SRCR Domäne 3 nicht für die Hb-induzierte IL-10-Expression verantwortlich ist oder dass die eingesetzte Antikörperkonzentration nicht ausreichend für eine optimale Blockierung von CD163 war. Unter der Annahme, dass die verwendeten Porphyrine über den selben Mechanismus die konstitutive Expression von HLA-DR vermindern, können die Daten aber ebenfalls dafür sprechen, dass die durch CoPP, Hämin und HbHg-Komplexen vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression unabhängig von einer Interaktion mit dem Hämoglobin-Scavenger Rezeptor CD163 ist.

4.5 Welche intrazellulären Signalwege werden durch Protoporphyrine beeinflusst ?

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die These, dass die Porphyrin-induzierte Überexpression von HO-1 zu einer Hemmung der MHC-II-Expression auf Monozyten führt. Allerdings zeigen die im Kapitel 4.3.4 präsentierten Ergebnisse, dass die durch CoPP und Hämin-induzierte Hemmung der HLA-DR-Expression über HO-1-unabhängige Mechanismus vermittelt wird. Mittels spezifischer siRNA wurde die Porphyrin-induzierte Expression von HO-1 zwar effektiv gehemmt (Abb. 25), allerdings blieb die CoPP- und Hämin-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression davon unbeeinflusst. Die Mechanismen der Porphyrin-vermittelten intrazellulären Signaltransduktion sind bis heute weitgehend unklar. Im Folgenden wurden daher verschiedene molekulare Mechanismen untersucht, die an der Regulation der HLA-DR-Expression beteiligt sind und daher von den Porphyrinen beeinflusst sein könnten.

4.5.1 Einfluss von CoPP auf die IFN- γ -induzierte STAT-1-Phosphorylierung

Wie in Kapitel 4.2.5 gezeigt, vermindert eine CoPP-Vorbehandlung die IFN- γ -induzierte Expression von CIITA. Durch die Interaktion von IFN- γ mit seinem Rezeptor (IFN- γ -R) wird eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade initiiert, in deren Folge durch Phosphorylierung der Transkriptionsfaktor STAT-1 aktiviert wird, welcher dann die Expression von CIITA induziert (siehe Kapitel 1.6).

Im folgenden Versuch wurde untersucht, inwiefern eine CoPP-Präinkubation die IFN- γ -induzierte STAT-1-Phosphorylierung beeinflusst. Da intrazelluläre Phosphorylierungskaskaden nach Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung in der Regel sehr schnell aktiviert werden, wurden PBMCs nach einer 15h Vorbehandlung mit 30 μ M CoPP 15min mit IFN- γ stimuliert und direkt anschließend die STAT-1-Phosphorylierung mittels Durchflusszytometrie analysiert.

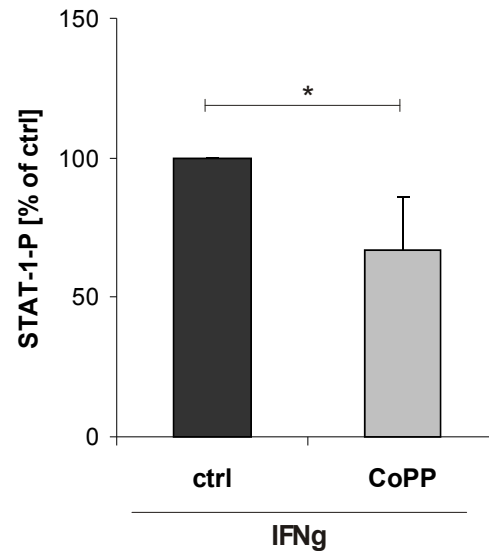


Abb. 30 Auswirkung einer CoPP Vorbehandlung auf die IFN- γ -induzierte STAT-1 Phosphorylierung

PBMCs wurden 15h +/- 30 μ M CoPP vorbehandelt, gewaschen und anschließend für 15min mit 10ng/ml IFN- γ stimuliert. Zur Analyse der intrazellulären STAT-1-Phosphorylierung wurden die Zellen sofort nach der Stimulation fixiert, wie unter Kapitel 3.9.7 angegeben gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten als prozentualer Wert der Kontrollzellen. $*=p<0,05$.

Die Analyse zeigt, dass eine CoPP-Behandlung die IFN- γ -induzierte Phosphorylierung von STAT-1 signifikant hemmt, so dass die Hemmung der IFN- γ -induzierten HLA-DR-Expression (siehe 7.2.5) mit einer verminderten Phosphorylierung von STAT-1 erklärt werden kann. Im Gegensatz dazu hat CoPP jedoch keinen Einfluss auf die kaum vorhandene konstitutive STAT-1 Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt). Die Porphyrin-induzierte Hemmung der konstitutiven monozytären HLA-DR-Expression ist daher eher unabhängig von STAT-1.

4.5.2 Einfluss von CoPP auf die STAT-3-Phosphorylierung in humanen Monozyten

Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass im Mausmodell die CoPP-vermittelte Hemmung der LPS-induzierten DC-Reifung von einer Aktivierung des STAT-3 Signalweges abhängt und unabhängig von der CoPP-induzierten HO-1-Hochregulation ist. Durch Blockieren der STAT-3-Aktivität mittels siRNA und einem STAT-3/JAK-2 Inhibitor (JSI124) wurde die CoPP-vermittelte Hemmung der LPS-induzierten MHC-II-Expression in murinen DC aufgehoben [125].

Wenn die CoPP-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression auch im Menschen von STAT-3 abhängt, sollte auch hier eine Hemmung des STAT-3-Signalweges die CoPP-induzierte Hemmung der HLA-DR-Expression aufheben.

Um diese Hypothese zu untersuchen wurde die Auswirkung einer STAT-3-Hemmung mittels JSI 124 auf die CoPP- bzw. Hämin-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression in Monozyten untersucht.

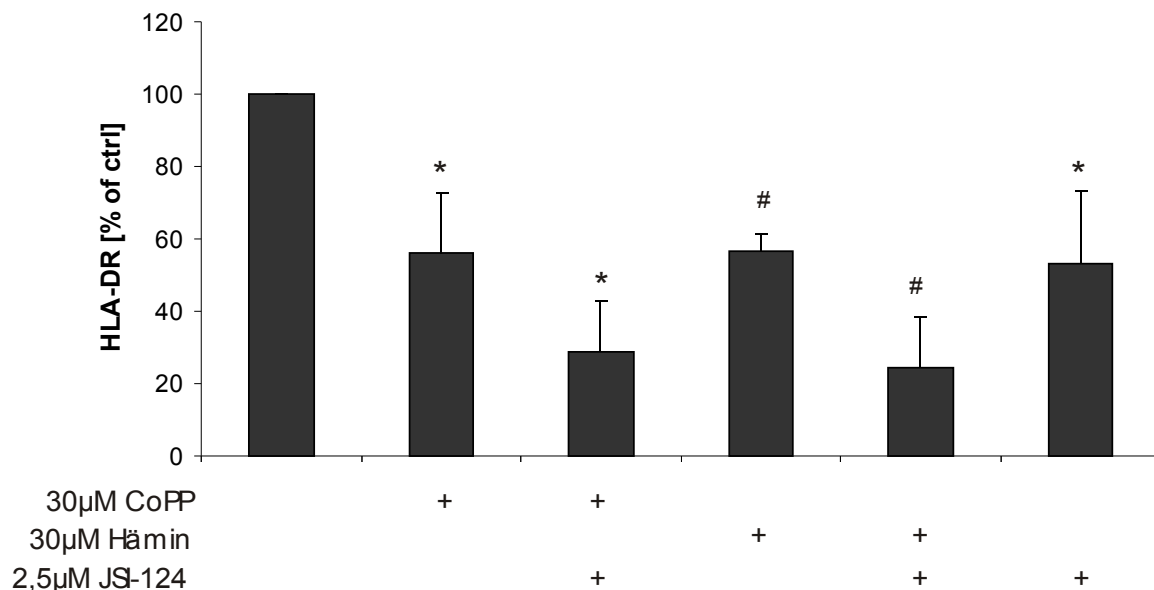


Abb. 31 HLA-DR-Expression nach Hemmung des STAT3/JAK Signalweges

PBMCs wurden 15h +/- 30µM CoPP bzw. +/- 30µM Hämin in An- oder Abwesenheit von 2,5µM JSI-124 inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Medium gewaschen und anschließend weitere 24h inkubiert. Die HLA-DR-Expression der CD14-positiven Monozyten wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 5 (CoPP-Behandlung) bzw. 3 (Hämin-Behandlung) unabhängigen Experimenten als prozentualer Wert der unbehandelten Kontrollzellen. Signifikanzen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen: *=p<0,05; #p=0,109

Die Daten zeigen, dass eine pharmakologische Hemmung der STAT-3-Phosphorylierung nicht zu einer Aufhebung der CoPP-vermittelten Hemmung der HLA-DR-Expression führte. Vielmehr scheint JSI124 die Porphyrin-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression zu verstärken. Diese Daten sprechen gegen die im Mausmodell gezeigte STAT3-Abhängigkeit der inhibitorischen CoPP-Effekte auf die HLA-DR-Expression in humanen Monozyten.

Auf einen STAT-3 unabhängigen Mechanismus deutet auch die Analyse der STAT-3-Phosphorylierung mittels Western Blot und durchflusszytometrischer Analyse. Als Positivkontrolle diente jeweils die Stimulation mit IL-6 und IL-10. Beide Zytokine induzieren eine STAT-3-abhängige Signalweiterleitung [126,127,128], so dass schon nach 15 Minuten Inkubation eine Phosphorylierung von STAT-3 nachweisbar ist.

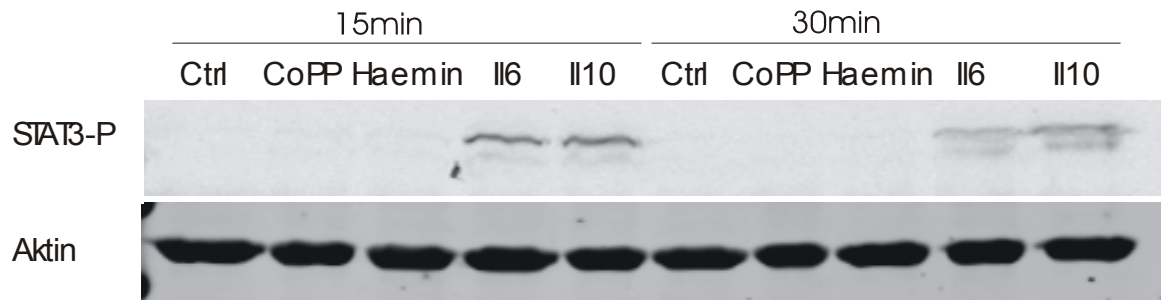


Abb. 32 STAT-3 Tyrosin-Phosphorylierung nach Porphyrinbehandlung

Separierte Monozyten wurden 15min mit 10ng/ml IL10 und 500pg/ml IL-6, sowie 15min bzw. 30min +/- 30µM CoPP bzw. +/- 30µM Hämin inkubiert, anschließend sofort im entsprechenden Lysepuffer lysiert und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Mittels Western Blot wurde die STAT-3 Tyr705 Phosphorylierung analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Experimenten.

Die Proteinanalyse der STAT-3-Phosphorylierung mittels Western Blot zeigt, dass unbehandelte Monozyten konstitutiv keine STAT-3-Phosphorylierung aufweisen. Auch in den CoPP- und Hämin-behandelten Zellen ist keine STAT-3-Phosphorylierung zu detektieren, während in den mit IL-10 und IL-6 behandelten Positivkontrollen nach 15min eine gute STAT-3-Phosphorylierung messbar ist.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Messung der intrazellulären STAT-3-Phosphorylierung mittels Durchflusszytometrie (Abb. 33). Weder nach 15min (Abb. 32, Abb. 33A+B) noch nach 15h (Abb. 33B) Inkubation ist eine konstitutive Phosphorylierung von STAT-3 zu detektieren. In der mit IL-10 behandelten Positivkontrolle ist jedoch eindeutig eine STAT-3 Phosphorylierung zu messen. Da in den unbehandelten Kontrollzellen keine Hinweise auf eine konstitutiv erhöhte STAT-3 Phosphorylierung zu finden sind, deuten diese Ergebnisse zudem darauf hin, dass die inhibitorische Wirkung von JSI124 ein STAT-3-unabhängiger Effekt ist.

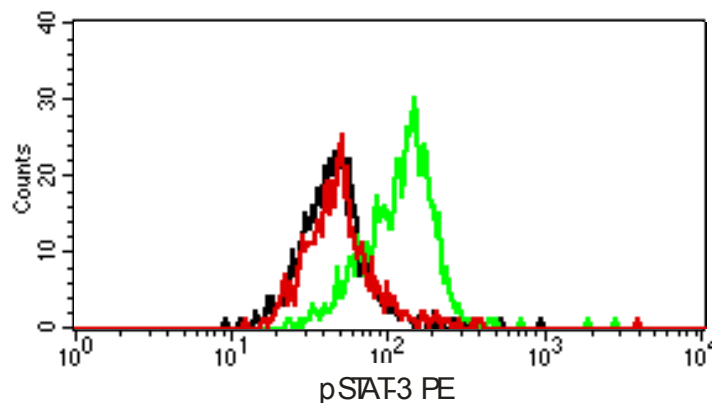
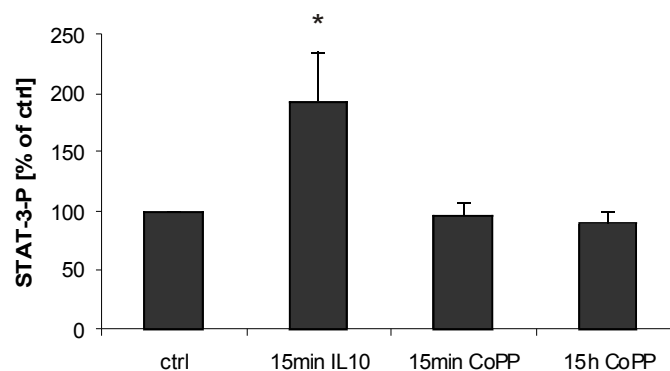
A**B**

Abb. 33 STAT-3 Tyrosin-Phosphorylierung nach CoPP-Behandlung

(A)+ (B) PBMCs wurden mit Medium (schwarze Linie, Kontrolle), 15min (rote Linie) bzw. 15h (nicht gezeigt) mit 30 μ M CoPP, sowie 15min mit 10ng/ml IL-10 (grüne Linie; Positivkontrolle) inkubiert und anschließend sofort die intrazelluläre STAT-3-Tyr705 Phosphorylierung in Monozyten, mittels Durchflusszytometrie, wie in Kapitel 3.9.8 angegeben, analysiert. In Abb. (B) ist die STAT-3 Phosphorylierung in Monozyten als Mittelwert mit Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten als prozentualer Wert der unbehandelten Kontrollzellen gezeigt. Signifikanz gegenüber den unbaehandelten Kontrollzellen: $*=p<0,05$.

4.5.3 Beeinflussung der CoPP-Effekte durch Hemmung der Histondeacetylierung

Die im Kapitel 4.2 präsentierten Befunde zeigen, dass eine Präinkubation mit CoPP zu einer Beeinträchtigung der Genexpression von CIITA und HLA-DR führt. Ursache dafür kann eine Beeinflussung der Histonacetylierung/Deacetylierung sein. Mit Hilfe des HDAC-Inhibitors Trichostatin A (TSA) wurde deshalb untersucht, ob bei der CoPP-induzierten Hemmung der konstitutiven HLA-DR-Expression in Monozyten eine verstärkte Deacetylierung eine Rolle spielt.

Dazu wurden PBMCs 15h synchron mit 100ng/ml TSA und 30µM CoPP behandelt, anschließend weitere 24h mit Medium inkubiert und die monozytäre HLA-DR-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die eingesetzte TSA-Konzentration entsprach dabei der höchstmöglichen nichttoxischen Konzentration (Zellviabilität überprüft mittels Trypanblau-Färbung), welche auch in publizierten Studien verwendet wird [129].

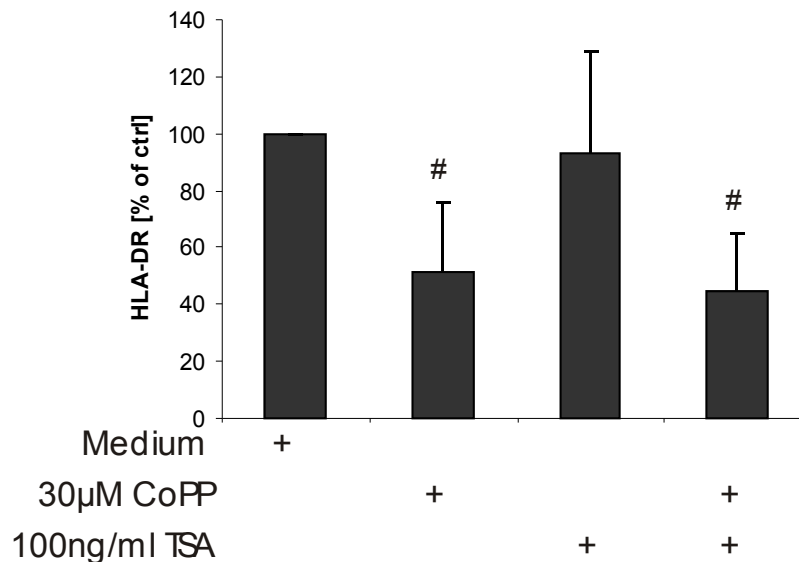


Abb. 34 HLA-DR Expression nach HDAC-Hemmung

PBMCs wurden 15h +/- 100ng/ml TSA, sowie +/- 30µM CoPP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium (RPMI komplett) gewaschen und weitere 24h inkubiert. Die Analyse der HLA-DR Expression auf CD14-positiven Monozyten erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten als prozentualer Wert der unbehandelten Kontrollzellen. #= $p=0,068$

Das Ergebnis zeigt, dass eine Hemmung der Deacetylierung mittels TSA weder einen Einfluss auf die konstitutive MHC-II-Expression hat, noch die CoPP-vermittelte Hemmung der HLA-DR Expression aufheben kann. Eine verstärkte HDAC-Aktivität scheint demnach nicht an den CoPP-vermittelten Effekten auf die HLA-DR-Expression beteiligt zu sein.

4.5.4 Beeinflussung der Porphyrin-Effekte durch Hemmung von Protein Kinase A

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) überträgt nach Aktivierung Phosphatgruppen und ist so in der Lage andere Moleküle zu beeinflussen. Literaturdaten deuten u.a. auf eine Beteiligung von PKA an der Regulation von MHC-II hin (Kapitel 1.6.2). Aus diesem Grund wurde im folgenden Versuch untersucht, ob eine Beeinflussung der PKA-Aktivität eine Auswirkung auf die konstitutive und CoPP-vermittelte Hemmung der monozytären HLA-DR-Expression hat. Eine

Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels Forskolin steigert die PKA-Aktivität, während der Einsatz des cAMP-Antagonisten Rp-8-Br cAMP die Aktivität von PKA hemmt. Rp-8-Br cAMP ist ein membrangängiges cAMP-Analog, welches irreversibel an die regulatorische Untereinheit des PKA R_2C_2 -Komplexes bindet, dadurch die cAMP-Bindestelle blockiert und die Dissoziation der Untereinheiten verhindert.

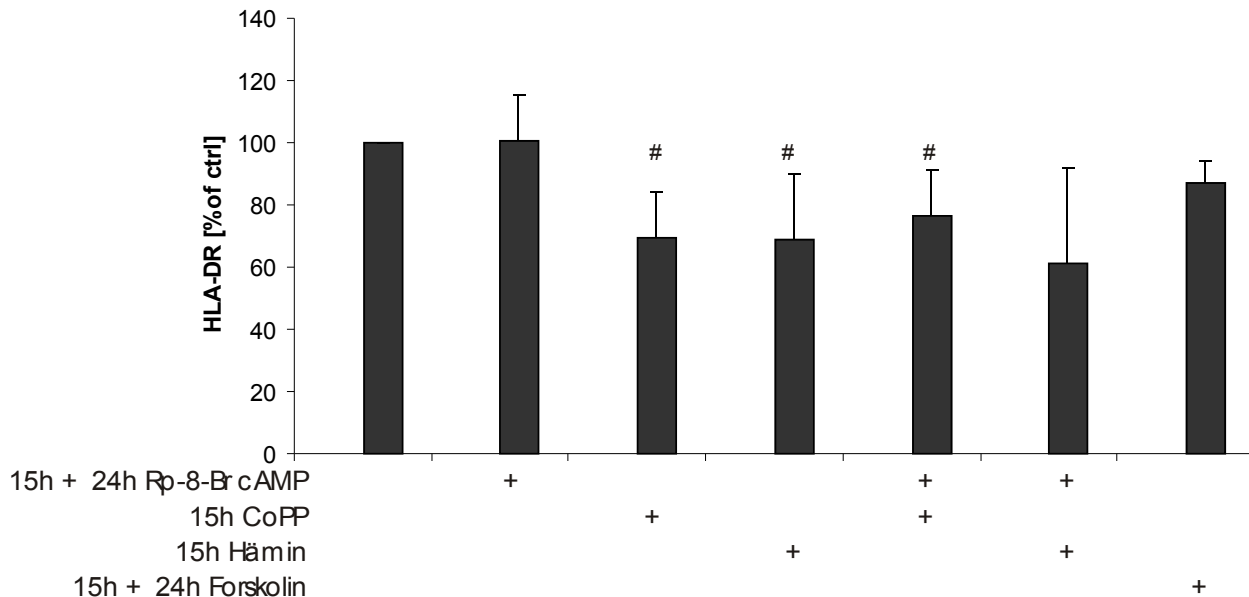


Abb. 35 HLA-DR Expression nach Hemmung von PKA

PBMCs wurden 15h mit 100µM Rp-8-Br cAMP, 30µM CoPP, 30µM Hämin bzw. 100µM Forskolin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und weitere 24h +/- 100µM Rp-8-Br cAMP und 100µM Forskolin inkubiert. Die Analyse der HLA-DR Expression der CD14-positiven Monozyten erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 4 (bzw. 2 [Hämin]) unabhängigen Experimenten als prozentualer Wert der unbehandelten Kontrollzellen. #= $p=0,068$

Weder eine Behandlung mit Forskolin noch eine Hemmung der PKA-Aktivität mittels Rp-8-Br cAMP beeinflusst die konstitutive HLA-DR-Expression in humanen Monozyten. Zudem hebt eine PKA-Hemmung die CoPP- und Hämin-vermittelte Hemmung der HLA-DR Expression nicht auf. Die Porphyrin-vermittelte MHC-II-Hemmung ist demnach unabhängig von einer PKA-Aktivierung.

4.5.5 Beeinflussung der konstitutiven HLA-DR-Expression durch MAPK

Bei der intrazellulären Signalweiterleitung spielen Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK) in der Regel eine wichtige Rolle. Da für keinen der bisher getesteten Signalwege eindeutig eine Beteiligung an der Porphyrin-vermittelten Hemmung der monozytären HLA-DR-Expression gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Versuch eine mögliche Beteiligung der MAPK p38 und JNK an der konstitutiven HLA-DR-Expression in Monozyten untersucht.

PBMC wurden 15h mit dem p38-Inhibitor SB203580 und dem JNK-Inhibitor SP600125 inkubiert und anschließend die HLA-DR-Expression im Vergleich zu unbehandelten und Porphyrin-behandelten Zellen analysiert.

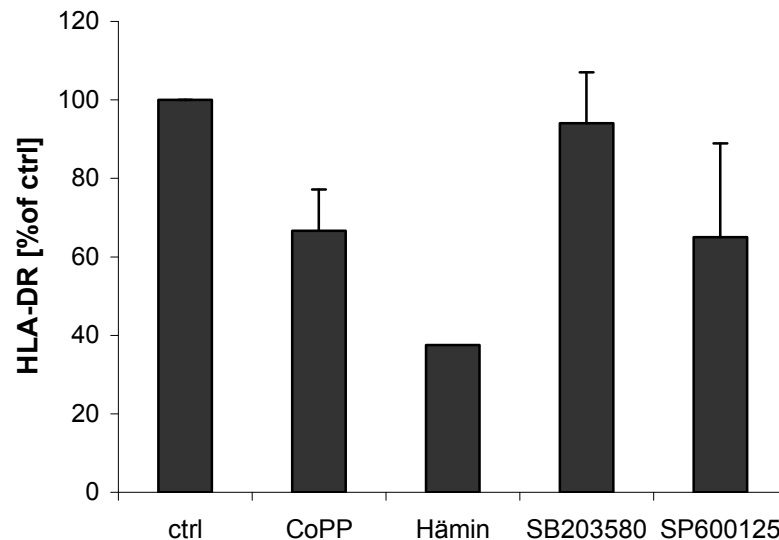


Abb. 36 HLA-DR Expression nach Hemmung von p38 und JNK

PBMCs wurden 15h mit 30 μ M CoPP, 30 μ M Hämin, 10 μ g/ml SB203580 (p38-Inhibitor) und 10 μ M SP600125 (JNK-Inhibitor) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und weitere 24h in An- und Abwesenheit der beiden Inhibitoren inkubiert. Nach der Inkubation wurde die HLA-DR Expression der CD14-positiven Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten (außer Hämin, da $n=1$) als prozentualer Wert der unbehandelten Kontrollzellen.

Eine Hemmung von p38 mittels SB203580 hatte keinen Effekt auf die konstitutive HLA-DR-Expression, wohingegen eine Behandlung mit dem JNK-Inhibitor SP600125 zu einer verminderten MHC-II-Expression führte. Dies kann auf eine Beteiligung des JNK-Signalweges an der konstitutiven HLA-DR-Expression hindeuten. Eine Western Blot Analyse der JNK-Phosphorylierung in unbehandelten oder Porphyrin-behandelten Monozyten zeigte jedoch keine Phosphorylierung von JNK (Daten nicht gezeigt), so dass auch unspezifische Inhibitoreffekte für die Hemmung der HLA-DR-Expression in SP600125-behandelten Monozyten verantwortlich sein könnten. Um hier eine eindeutige Aussage zu treffen, wären weitere Versuche mit anderen JNK-Inhibitoren sinnvoll.

5. Diskussion

Infektionen, Verletzungen und Trauma führen normalerweise zu einer Entzündungsreaktion, in deren Verlauf es zu effektiven Bekämpfung der Erreger, Regeneration geschädigten Gewebes und Wiederherstellung der Homöostase kommt. Durch Aktivierung gewebeständiger Immunzellen, der Komplementkaskade sowie des Gefäßendothels dringen verstärkt zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems in das betroffene Gewebe ein und beseitigen geschädigte Zellen sowie gegebenenfalls eingedrungene Erreger. Gleichzeitig werden Wundheilung und Geweberegeneration angeregt [130]. Bei einer lokalen Entzündungsreaktion überwiegen in der Regel die positiven Effekte der Infektionsabwehr und der Regeneration des Gewebes. Bei einer systemischen Entzündungsreaktion kann sich jedoch schnell eine pathologische Situation entwickeln, bei der es zu Zytokin-induzierten Gewebeschädigungen und Organversagen bis hin zum Tod kommen kann. Eine systemische Entzündung induziert, ähnlich einer lokalen Entzündung, eine systemische antiinflammatorische Gegenreaktion (CARS= Compensatory Antiinflammatory-Response Syndrome). In Folge von sterilen Traumata (z.B. nach Schlaganfall) wird die neurohumorale Stressachse aktiviert und die vermehrte Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren induziert [131,132]. Kommt es dabei zu einer Fehlregulation, kann sich eine ausgeprägte, langanhaltende Depression des Immunsystems (Immunparalyse) manifestieren. Die klinischen Zeichen der Immunparalyse sind ein erhöhtes Risiko für sekundäre Infektionen sowie Wundheilungsstörungen, wodurch sich die Prognose der Patienten stark verschlechtert. Obwohl verschiedene antiinflammatorische Mediatoren (z.B. IL-10, TGF- β) als Vermittler einer Immundepression diskutiert werden, ist die genaue molekulare Ursache für eine langanhaltende Hemmung des Immunsystems bis heute nicht bekannt. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen bei der Entwicklung einer Immundepression kann jedoch neue Therapiemöglichkeiten aufdecken, um schon frühzeitig der Manifestation einer Immundepression entgegen zu wirken. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Rolle des Hitzeschockproteins Hämoxxygenase-1 (HO-1) als möglichen molekularen Mediator einer Monozytendeaktivierung, welche charakteristisch für eine Immundepression ist.

5.1 Die Rolle der HO-1 bei den Protoporphyrin-vermittelten Effekten auf den Phänotypen von Monozyten

Eine Deaktivierung bzw. eine Umprogrammierung von Monozyten mit stark verminderter HLA-DR-Expression und gehemmter LPS-induzierter TNF- α -Produktion ist kennzeichnend für eine Immundepression.

Ein Zusammenhang zwischen HO-1-Induktion und verminderter MHC-II-Expression wurde in einer Studie mit DCs aus der Ratte gezeigt, in der eine Induktion der HO-1-Expression mittels CoPP in naiven DCs zu einer Hemmung der LPS-induzierten MHC-II- und CD86-Expression führte [133]. Diese Studie zeigte zudem, dass auch in humanen DCs die LPS-induzierte CD86-Expression nach HO-1-Induktion gehemmt ist. Um eindeutig einen Zusammenhang zwischen HO-1-Induktion und verminderter HLA-DR-Expression in humanen Zellen herzustellen, fehlte allerdings die Analyse der MHC-II-Expression. In Vorarbeiten mit humanen Primärzellen konnte eine Korrelation zwischen HO-1-Überexpression und verminderter MHC-II-Expression in myeloiden APC gezeigt werden. Eine 15-stündige Vorbehandlung von humanen Monozyten, MDDC (monocyte derived dendritic cell) und Makrophagen mit CoPP resultierte in einer gesteigerten Expression von HO-1 und inhibierte zudem sowohl die IFN- γ - als auch die LPS-induzierte HLA-DR-Expression [48]. Diese Hemmung war bis zu 24h nach Entfernen des Induktors signifikant gegenüber unbehandelten Zellen. Eine Suppression von MHC-II und costimulatorischen Molekülen wie CD40 und CD86 resultiert zudem in einer verminderten antigen-abhängigen Aktivierung von T-Zellen, während die mitogen-abhängige Aktivierung unbeeinflusst bleibt [73]. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die CoPP-vermittelte Induktion der HO-1-Expression in Monozyten mit einer Hemmung der konstitutiven Expression von HLA-DR, sowohl auf Proteinebene (Abb. 15) als auch auf mRNA-Ebene (Abb. 16) korreliert. Dieser Effekt ist spezifisch für die MHC-II-Expression auf Monozyten, da weder ihre MHC-I-Expression (Abb. 17A) noch die HLA-DR-Expression auf B-Zellen (Abb. 17B) durch eine CoPP-Behandlung beeinflusst wurden.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für das natürliche vorkommende Porphyrin Hämin. Hämin besteht wie CoPP aus vier Porphyrinringen, hat jedoch als Zentralion ein dreiwertiges Eisen und nicht wie CoPP ein Cobaltion. Hämin gilt als physiologischer HO-1 Induktor und findet in der Klinik bei der Behandlung von akuten Porphyrieschüben Einsatz [134]. Eine Präinkubation von Monozyten mit Hämin induziert, ähnlich wie CoPP, die Expression von HO-1 (Abb. 22) und resultiert zudem in einer verminderten Expression von HLA-DR (Abb. 24).

Sowohl die konstitutive als auch die IFN- γ induzierte HLA-DR-Expression wird maßgeblich durch die Expression des MHC-II Masterregulators (CIITA) reguliert [91]. Eine CoPP-Präinkubation vermindert die konstitutive (Abb. 19) und IFN- γ -induzierte (Abb. 20) CIITA-Expression in Monozyten, was mit einer gleichzeitig verminderten HLA-DR-Expression einhergeht. Zudem ist auch die Expression der CD74- und HLA-DM-mRNA nach Präinkubation mit dem HO-1-Induktor im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen bis zu 24h signifikant vermindert (Abb. 18 C und B). CIITA koordiniert neben der HLA-DR-Expression auch die Transkription von CD74 und HLA-DM [89]. Damit spiegeln die hier gezeigten Porphyrin-Effekte die Ergebnisse einer Genexpressionstudie in Patienten mit septischen Schock wieder. In den peripheren

Blutleukozyten dieser Patienten wurde im Vergleich zu gesunden Probanden eine verminderte Expression von HLA-DR, CD74 und CIITA sowohl an Tag 1-3 als auch an Tag 4-10 nach der Diagnose detektiert [135]. Eine CoPP-induzierte HO-1-Hochregulation hatte dagegen keine Auswirkungen auf die von CIITA-unabhängige mRNA-Expression von CD86 (Abb. 18A). Auch die Expression von Cathepsin S (Cath.S), einer für die Degradierung von CD74 essentiellen Cystein-Protease, wird nicht von CIITA reguliert. Dennoch ist direkt nach Porphyrin-Behandlung ein verminderter Cath. S mRNA-Level zu detektieren, der allerdings nach Entfernen des HO-1 Induktors innerhalb von 24h wieder auf Kontrollniveau ansteigt (Abb. 18B). Die Hemmung der Protease kann daher eventuell ein direkter (CIITA-unabhängiger) Effekt von CoPP sein, wofür auch die schnelle Reversibilität der Hemmung nach Entfernen von CoPP spricht. Die beobachtete Hemmung der MHC-II-Expression ist also vermutlich auf die durch Porphyrine gehemmte CIITA Expression zurückzuführen. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass eine Präinkubation von Monozyten mit den Porphyrinen CoPP und Hämin in einer Hochregulation der HO-1-Expression resultiert, gleichzeitig wird eine Hemmung der CIITA-Expression und der CIITA-regulierten Moleküle HLA-DR, CD74 und HLA-DM beobachtet. Um einen direkten Zusammenhang beider Effekte zu zeigen, ist der Nachweis der HO-1-Spezifität von besonderer Bedeutung. In der Literatur wird die Spezifität hauptsächlich durch Hemmung der HO-1 mittels SnPP (Zinn-Protoporphyrin) und ZnPP (Zink-Protoporphyrin) gezeigt. Beide Porphyrine hemmen auf Grund ihres Metallions irreversibel die Funktion von HO-1. So wurde die HO-1-Spezifität in einer Studie mit humanen DC dadurch belegt, dass SnPP als Inhibitor von HO-1 keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Reifung der DCs hat, während der HO-1-Induktor CoPP die LPS-induzierte Reifung der DCs hemmt [133]. Allerdings wurden die Zellen nie gleichzeitig mit CoPP und SnPP inkubiert, um zu zeigen, dass die CoPP-Effekte tatsächlich HO-1 abhängig sind und damit durch SnPP aufgehoben werden können.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die HO-1-Spezifität der CoPP-Effekte mittels spezifischer siRNA geprüft. Das Einbringen von siRNA mittels physikalischer Verfahren bedeutet jedoch in den meisten Fällen sehr viel Stress für die Zellen. Eigene Beobachtungen zeigen, dass besonders Monozyten nach der Transfektion sehr empfindlich gegenüber weiteren Reizungen (z.B. mechanische Reizungen durch Pipettieren) sind. Für die Vitalität der Zellen war es daher unabdingbar, diese nach der Transfektion sehr zügig, aber vorsichtig in vorgewärmtes Medium aufzunehmen, und eine Zeit lang ruhen zu lassen (siehe Kapitel 3.9.9). Die transfizierten Monozyten zeigten grundsätzlich eine niedrigere HLA-DR-Expression als nicht-transfizierte Monozyten. Dies lässt sich vermutlich durch die physikalische Zerstörung der Membranintegrität durch die Transfektion erklären, durch die auf der Oberfläche befindliche Moleküle verloren gehen. Dennoch gehen wir von einem vergleichbaren Verhalten der transfizierten und nicht-transfizierten Zellen aus, da die Viabilität der überlebenden Zellen keine Auffälligkeiten zeigte.

(Viabilität getestet mittels Trypanblaufärbung). Zudem ließ sich in den mit Kontroll-siRNA und ohne siRNA transfizierten Zellen durch eine CoPP-Behandlung die HO-1-Expression induzieren (vgl. Abb. 25), während konstitutiv keine HO-1-Expression zu detektieren war.

Unter der Annahme, dass die beobachteten Effekte direkt von HO-1 und nicht von den HO-1-Induktoren abhängen, sollte eine Hemmung der HO-1-Expression die nach Porphyrin-Behandlung beobachteten Effekte aufheben. Wider Erwarten konnten jedoch trotz optimaler Hemmung der HO-1-Expression (Abb. 25) die Protoporphyrin-vermittelte MHC-II-Hemmung nicht aufgehoben werden (Abb. 26). Die CoPP- und Hämin-vermittelte Suppression der MHC-II-Expression wird demnach nicht durch die gleichzeitig induzierte HO-1 Expression sondern über einen HO-1-unabhängigen Signalweg vermittelt. Somit wurde die eingangs aufgestellte Hypothese, dass eine Induktion von HO-1 die antigenpräsentierende Eigenschaft von APCs vermindert, widerlegt. Die Daten zeigen, dass Porphyrine selbst weitreichende immunmodulatorische Eigenschaften haben und eine wichtige Rolle bei der Regulation und Begrenzung von Immunantworten spielen können.

5.2 Die Rolle von CD163 bei den Protoporphyrin-vermittelten Effekten auf den Phänotypen von Monozyten

Die verwendeten Protoporphyrine CoPP und Hämin weisen sehr große strukturelle Ähnlichkeiten zu dem physiologisch vorkommenden Hämprotein auf, welches zusammen mit drei weiteren Hämproteinen ein Hämoglobinmolekül bildet. Freies Hämoglobin wird mit Hilfe von Scavengerproteinen (Hemopexin, Haptoglobin) rezeptorabhängig in die Zelle aufgenommen und dort mittels Hämoxygenase abgebaut. Die strukturelle Ähnlichkeit der Protoporphyrine führt zu der Überlegung, dass die drei Moleküle über denselben Mechanismus in die Zelle gelangen und daher die gleichen Effekte auf die Zellen haben. So zeigte sich, dass eine Behandlung von humanen Monozyten sowohl mit freiem Hämoglobin (Hb) (Abb. 29) als auch mit Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen (Abb. 27B) zu einem ähnlichen Phänotyp (Hemmung der MHC-II Expression) führt, wie nach einer Behandlung mit CoPP und Hämin (Abb. 29) zu beobachten ist. Dies kann in der Klinik z.B. bei der verstärkten Freisetzung von Hämoglobin in Folge von großflächigen Verletzungen, bei der es zu starken Blutungen und Hämolyse kommen kann, eine wichtige Rolle spielen. Freiem Hämprotein werden immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Bis heute sind jedoch hauptsächlich proinflammatorische Effekte, wie die Induktion von proinflammatorischen Adhäsionsmolekülen, beschrieben [75]. Zudem wirkt Häm in hohen Konzentrationen durch die Generierung von reaktivem Sauerstoff (ROS = reaktive Sauerstoffspezies) cytotoxisch. Eine Studie aus dem Jahr 1996 weist jedoch auf eine immunhemmende Wirkung von Porphyrinen hin. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in Hämatoporphyrin- (ein Porphyrinmetabolit), Hämin- und Hämoglobin-behandelten

Peritonealmakrophagen der Maus die MHC-II-abhängige T-Zellaktivierung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen gehemmt ist [136] . Dies lässt sich durch eine Porphyrin-induzierte Hemmung der MHC-II-Expression erklären, welche in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

Freies Hämoglobin kann sowohl an Hemopexin als auch an Haptoglobin binden. Hemopexin zählt zu den Hämoglobin-Binde-Proteinen und ist für die Aufnahme von Hämoglobin via LPR (low density lipoprotein receptor-related protein) / CD91 zuständig. In humanen Hepatoma-Zellen zeigte sich, dass sowohl Hämprotein als auch CoPP an Hemopexin bindet. Allerdings führte der CoPP-Hemopexin-Komplex weder zu einer HO-1-Induktion noch zu einem Anstieg der intrazellulären CoPP-Konzentration in den Hepatoma-Zellen. Im Gegensatz dazu war nach der Inkubation mit freiem CoPP sowohl ein Anstieg der HO-1-mRNA als auch ein Anstieg der intrazellulären CoPP-Konzentration zu detektieren [137] . Hemopexin ist demnach nicht für die Aufnahme von CoPP in die Zelle verantwortlich. Das Bindeprotein spielt auch bei der Hämoglobin-Aufnahme nur eine untergeordnete Rolle. Als eigentliches Hämoglobin-Binde-Protein gilt das Plasmaprotein Haptoglobin, welches die Aufnahme von Hämoglobin über CD163, dem Hämoglobin-Scavenger Rezeptor, induziert. Der Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex (HbHg) interagiert mit CD163, wodurch die Aufnahme des Komplexes durch Endozytose in die Zellen initiiert wird [80] . Allerdings wurde gezeigt, dass auch freies Hämoglobin an CD163 binden und in die Zelle aufgenommen werden kann. Dies scheint insbesondere bei hohen Plasmakonzentrationen von Hb von Bedeutung zu sein [79] . Nach der Aufnahme wird das Häm mit Hilfe der Hämoxygenase in CO, Bilirubin/Biliverdin und Ferritin degradiert. Dies bestätigt eine Studie mit humanen, aus Monozyten gereiften, Makrophagen, in der sowohl HbHg als auch freies Hb durch Interaktion mit CD163 endozytiert wurden und es zu einer Induktion der HO-1-Expression kommt [138] . CD163 wird hauptsächlich von Monozyten (und Makrophagen) exprimiert [86,122] , was durch die hier präsentierten Ergebnissen bestätigt wird (Abb. 27A). Über die weiteren intrazellulären Mechanismen, die durch eine Interaktion von HbHg mit CD163 induziert werden, ist bis heute jedoch nur wenig bekannt. Ritter et al. postulieren, dass die CD163-vermittelte Sekretion proinflammatorischer Zytokine von der Interaktion der intrazellulären Rezeptordomäne mit Casein-Kinase-II und PKC abhängt [139] . Zudem ist bekannt, dass die Interaktion von HbHg mit CD163 zu einer starken IL-10 Synthese führt [87] . Die hier präsentierten Daten zeigen, dass neben HbHg auch Hämin, jedoch nicht CoPP, die IL-10 Expression in human PBMC induziert (Abb. 28A). Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 ist in der Lage die Expression von HLA-DR zu inhibieren [35,95,96] , so dass eine erhöhte IL-10-Expression besonders im Hinblick auf die verminderte monozytäre MHC-II-Expression in Folge einer Porphyrin-Behandlung von Bedeutung sein kann. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass eine Neutralisation von IL-10 die Porphyrin-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression nicht

aufhebt (Abb. 28B), so dass von einem IL-10-unabhängigen Mechanismus ausgegangen werden kann.

CD163 ist ein 130kDa großer transmembraner Rezeptor, welcher aus neun SRCR (Scavenger Receptor Cysteine Rich) Domänen, einem Transmembranelement und einem kurzen cytoplasmatischen Schwanz besteht [81]. Für die Interaktion mit dem HbHg-Komplex scheint insbesondere die SRCR Domäne 3 essentiell zu sein. Eine proteolytische Spaltung dieser Domäne kann die Bindung von HbHg an den Rezeptor verhindern. Zudem kann durch Blockieren der SRCR Domäne 3 mittels eines spezifischen Antikörpers (Klon EDHu-1) die Bindung ebenfalls verhindert werden [124]. Unter der Annahme, dass die Porphyrin-vermittelten Effekte von einer Interaktion mit CD163 abhängen, sollte ein Blockieren des Rezeptors durch den Antikörper EDHu-1 die Porphyrin-induzierte Hemmung der HLA-DR-Expression aufheben. Der in dieser Arbeit zur Blockierung von CD163 verwendete Antikörperklon EDHu-1 war allerdings stark mit Endotoxin kontaminiert, wodurch es zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen kann. Endotoxine (Lipopolysaccharid=LPS, das Toxin gram-negativer Bakterien) sind sehr potente Immunmodulatoren und induzieren z.B. die Reifung von DC. Hohe Dosen von LPS können aber auch zu einer Desensibilisierung von Monozyten und DC führen, so dass diese auf weitere Stimuli nicht mehr reagieren [140,141]. Nach der Aufreinigung des Antikörpers hatte dieser selbst keinen Effekt mehr auf die HLA-DR-Expression (Abb. 29), was darauf hin deutet, dass die anfänglich beobachteten inhibitorischen EDHu-1-Effekte (Daten nicht gezeigt) durch die Endotoxin-Kontamination vermittelt wurden. Jedoch konnte mit dem Blockieren der CD163 SRCR Domäne 3 auch nicht die Hb-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression aufgehoben werden (Abb. 29). Die Porphyrin-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression scheint also unabhängig von einer Interaktion mit CD163 zu sein. Die durch Hb-induzierte IL-10-Expression konnte jedoch ebenfalls nicht durch EDHu-1 aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Entweder war die eingesetzte Antikörperkonzentration zu niedrig oder die Hb-induzierte IL-10-Synthese ist unabhängig von einer Interaktion mit der SRCR Domäne 3 des Rezeptors. Zur genauen Klärung dieser Frage wären daher weitere Versuche notwendig. So sollte z.B. untersucht werden, ob durch das Blockieren anderer CD163-Domänen die Hb-induzierte IL-10-Expression gehemmt werden kann. Denkbar wäre hier die Verwendung des Antikörperklons RM3/1, welcher die SRCR Domäne 9 des Rezeptors blockiert. RM3/1 hemmt nur sehr schwach die Interaktion von HbHg mit CD163 [124], blockiert jedoch nahezu vollständig die HbHg-induzierte IL-10-Synthese in humanen Makrophagen [87]. In dieser Arbeit konnte der Antikörper-Klon RM3/1 nicht verwendet werden, da der kommerziell erhältliche Antikörper zu stark mit Endotoxin [20ng/ml] kontaminiert war (z.Vgl. EDHu-1: 0,0236ng/ml). Zudem sollte überprüft werden, ob die inhibitorischen Effekte weiterer Porphyrine wie CoPP und Hämin auf die MHC-II-Expression ebenfalls nicht durch CD163-Blockade beeinflusst werden. Auch eine mögliche Kreuzvernetzung und Aktivierung des

Rezeptors durch den CD163 Antikörper muss in Betracht gezogen werden. So zeigte eine Studie, dass eine Behandlung von humanen Makrophagen mit EDHu-1 zu einer gesteigerten IL-6- und IL-1 β -Sekretion führt, welche mit einer EDHu-1-vermittelten Kreuzvernetzung von CD163 erklärt wurde [142]. Allerdings scheint ein solcher Effekt zumindest in den vorliegenden Untersuchungen keine Rolle bei der Inhibition MHC-II-Expression gespielt zu haben, da die in Abb. 29 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Antikörper in der verwendeten Konzentration alleine keinen Einfluss auf die konstitutive HLA-DR hat.

5.3 Mechanismen der Porphyrin-vermittelten Hemmung der monozytären MHC-II Expression

Das heutige Wissen über die Regulation der MHC-II-Expression beruht zum Großteil auf Studien mit Zelllinien, welche einen genetischen Defekt in ihrer MHC-II Regulation aufweisen, oder mit B-Zellen und/oder DC, in denen z.B. die LPS- oder IFN- γ induzierte MHC-II Expression analysiert wurde [88,89,90,117,143,144]. Bis heute ist jedoch wenig über die Regulation der konstitutiven MHC-II Expression bekannt.

Zudem sind die durch Porphyrine wie Hämoglobin und Hämin induzierten intrazellulären Signalwege weitestgehend unbekannt, auch wenn Häm an der Regulation vieler biologischer Prozesse wie der Erythropoese, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung beteiligt ist [145,146,147]. Über Interaktion von Hämoglobin mit seinem Rezeptor CD163 wird die Freisetzung des antiinflammatorischen IL-10 induziert [87]. Freies Hämprotein wird jedoch auch im Zusammenhang mit der Induktion einer Entzündungsreaktion beobachtet [75,148], wobei insbesondere die proinflammatorische Wirkung durch die Generierung freier Sauerstoffradikale (ROS) gut beschrieben ist [149,150]. Die in dieser Arbeit gezeigte Hemmung der MHC-II-Expression in Folge einer Porphyrin-Behandlung wird in der Literatur meist der gleichzeitigen HO-1-Induktion und den Produkten der durch HO-1 katalysierten Reaktion zugeschrieben [48,133]. Zahlreiche Studien wurden in Tiermodellen und Zelllinien durchgeführt, jedoch fehlt in der Regel ein eindeutiger Nachweis der HO-1 Spezifität. Dieser Nachweis wird in der hier vorliegenden Arbeit durch die Hemmung der HO-1-Expression mittels siRNA erbracht (Abb. 25) und zeigt eindeutig, dass die Porphyrin-induzierte Hemmung der MHC-II-Expression in humanen Monozyten unabhängig von HO-1 ist (Abb. 26).

Da weder über die Regulation der konstitutiven MHC-II-Expression noch über die Porphyrin-induzierten intrazellulären Signalwege ausreichende Kenntnisse vorliegen, sollten durch die Analyse verschiedener intrazellulärer Mechanismen (STAT-Signalwege, Histonmodifikation, Proteinkinasen, MAPK-abhängige Signalwege) erste Anhaltspunkte auf eine mögliche Beeinflussung durch Protoporphyrine gefunden werden.

5.3.1 STAT-3

Dass die Porphyrin-vermittelte Hemmung der MHC-II Expression unabhängig von der gleichzeitig beobachteten Induktion der HO-1 ist, postulieren auch Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die CoPP-induzierte Hemmung der LPS-vermittelten DC-Reifung unabhängig von der HO-1-Hochregulation ist. Stattdessen konnte eine CoPP-vermittelte Aktivierung von STAT-3 nachgewiesen werden, deren Hemmung die CoPP-vermittelte Hemmung der DC-Reifung aufgehoben hat [125]. Im Menschen ist die Porphyrin-vermittelte Hemmung der monozytären MHC-II Expression jedoch unabhängig von STAT3, da eine Suppression des JAK/STAT-3 Signalweges die Porphyrin-Wirkung nicht aufheben konnte (Abb. 31). Zudem wurde weder im Western Blot (Abb. 32) noch durch eine intrazelluläre Färbung (Abb. 33) eine Porphyrin-induzierte (Tyrosin-) Phosphorylierung von STAT-3 in humanen Monozyten nachgewiesen. Neben der für die Aktivierung von STAT-3 wichtigen Tyrosin-Phosphorylierung ist auch eine Serin-Phosphorylierung von STAT-3 beschrieben [151]. Diese scheint besonders für die Translokation von STAT-3 in den Zellkern wichtig zu sein [152]. Allerdings konnte in der vorliegende Arbeit keine Serin-Phosphorylierung von STAT-3 nach Porphyrin-Behandlung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse widersprechen der im Mausmodell gezeigten STAT-3 Abhängigkeit der inhibitorischen CoPP-Effekte, lassen sich aber eventuell mit spezie-spezifischen Unterschieden erklären. Dessen ungeachtet resultiert eine Behandlung von humanen Monozyten mit dem JAK/STAT-3-Inhibitor in einer verminderten HLA-DR Expression. Eine mögliche konstitutive Aktivierung von JAK wurde jedoch durch eine Western Blot Analyse ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Auch die fehlende Phosphorylierung (und damit Aktivierung) von STAT-3 in unbehandelten und behandelten Zellen spricht gegen eine JAK/STAT-3 Beteiligung und deutet eher auf eine unspezifische Inhibitor-Wirkung hin.

5.3.2 STAT-1

In der Literatur wird eine Beteiligung des JAK/STAT-Signalweges an der MHC-II-Protein Expression hauptsächlich im Zusammenhang mit einer IFN- γ -induzierten HLA-DR-Expression diskutiert. Durch Interaktion von IFN- γ mit seinem Rezeptor kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Phosphorylierungskaskade, bei der es über Autophosphorylierung von JAK1/2 zu einer Aktivierung von STAT-1 kommt. Das sich bildende STAT-1-Homodimer fungiert als Transkriptionsaktivator von CIITA, welcher dann die MHC-II Expression induziert.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass eine CoPP-Behandlung die IFN- γ -induzierte Expression von HLA-DR inhibiert (Abb. 20A). Sowohl die konstitutive, als auch die induzierte HLA-DR-Expression hängt maßgeblich von der Regulation des MHC-II Masterregulators CIITA ab. In beiden Fällen hemmt eine Porphyrin-Behandlung die Expression von CIITA (Abb. 20C). Gleichzeitig wurde eine

verminderten IFN- γ -induzierte Phosphorylierung von STAT-1 (Abb. 30) in den CoPP-behandelten Zellen gemessen, so dass die Ursache der supprimierten IFN- γ -induzierten HLA-DR-Expression in einer Hemmung der STAT-1-abhängigen Signalweiterleitung liegt. Konstitutiv ist jedoch weder in unbehandelten Kontrollzellen noch in den Porphyrin-behandelten Zellen Phospho-STAT1 nachweisbar, so dass die Porphyrin-vermittelte Hemmung der konstitutiven MHC-II-Expression nicht von STAT-1 abhängen kann.

5.3.3 Histonmodifikation - Acetylierung

Die Histonmodifikation spielt bei der Regulation der Genaktivität eine große Rolle. So wird durch eine reversible Acetylierung der Lysinreste der Histone mittels Histon-Acetyltransferasen (HAT) gewährleistet, dass die Transkriptionsmaschinerie (Transkriptionsfaktoren, Polymerase etc) mit der Promotorregion des Zielgenes interagieren kann und die Transkription initiiert wird [153]. Auf der anderen Seite spielt die Deacetylierung mittels Histon-Deacetylasen (HDAC) [98] eine wichtige Rolle bei der „Stilllegung“ eines Gens. Viele Transkriptionsfaktoren können selbst die zur Acetylierung notwendigen HATs rekrutieren. So auch im Fall von CIITA, welcher u.a. mit den HATs CBP (CREB-binding protein) und p300 interagieren kann [88,90]. Eine Chip-Analyse mit Antikörpern spezifisch gegen CIITA und acetylierten Lysinresten an Histonen (H3, H4) zeigte, dass die Acetylierung des HLA-DR Promotors in Raji-Zellen (einer Wildtyp-B-Zell-Lymphoma Linie) von der Interaktion mit CIITA abhängt [154]. Die Genexpression kann jedoch auch durch eine Hemmung der Deacetylierung verstärkt werden. In der humanen Neuroblastoma-Tumorzelllinie SK-N-MC beobachtet man, dass die Inhibition der Deacetylierung die konstitutive MHC-II Expression steigern kann [129]. Ähnliches zeigte sich in HeLa-Zellen (human epithelial cell line). In diesen Zellen konnte IFN- γ -induzierte CIITA-Expression durch Hemmung der Histon-Deacetylasen mittels Trichostatin A (TSA) gesteigert werden [99].

Auf einen direkten Zusammenhang zwischen Histondeacetylierungen und MHC-II-Expression weisen jedoch ausschließlich Studien mit Zelllinien. In humanen, primären Monozyten hat eine Hemmung der Histondeacetylierung mittels TSA keine Auswirkung auf die konstitutive HLA-DR-Expression (Abb. 34). Auch die CoPP-vermittelte Hemmung der MHC-II-Expression war unabhängig von einer Hemmung der Histonacetylierung, so dass eine verstärkte Induktion der Histondeacetylierung nicht als Ursache für die MHC-II-hemmende Wirkung von Porphyrine in Frage kommt.

5.3.4 Proteinkinase A

In verschiedenen Studien wurde postuliert, dass die Aktivität des MHC-II Masterregulators CIITA u.a von seinem Phosphorylierungsstatus abhängt. So kann ein erhöhter intrazellulärer cAMP-

Level die antigenpräsentierende Funktion von DCs hemmen, indem die MHC-II-Expression vermindert wird [155]. In einer humanen Monozytenzelllinie (U937) ist das cAMP-induzierende Prostaglandin in der Lage, durch die Aktivierung von Proteinkinase A (PKA), die IFN- γ -induzierte HLA-DR-Expression zu inhibieren. Die Studie identifizierte eine PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle am CIITA-Molekül, dessen Mutation den hemmenden PKA-Effekt aufhob [103]. Dagegen spricht eine Studie mit einer Maus-Makrophagenzelllinie (RAW264.7). Hier beobachtete man, dass die PKA-induzierte Phosphorylierung von CIITA für eine maximale Aktivierung des Masterregulators essentiell ist [104]. Die Abhängigkeit der MHC-II-Expression von cAMP/PKA wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Erhöhung des cAMP-Levels supprimiert die MHC-II-Expression in Makrophagen und in B-Zellen aus der Maus [102,156]. Dagegen postuliert Chakrabarti et al., dass die MHC-II-Expression in Makrophagen aus der Maus unabhängig von cAMP/PKA ist [157]. In HeLa-Zellen und Glioblastomazellen konnte eine Aktivierung von PKA indessen die Expression von MHC-II erhöhen [103,158]. Dieser Gegensatz lässt sich evtl. mit Spezies- und zelltypspezifischen Unterschieden in der Regulation der MHC-II-Expression erklären. Auf die konstitutive HLA-DR-Expression hat PKA jedoch keine Auswirkung. Weder die Hemmung von PKA noch die Aktivierung durch cAMP-erhöhende Stimulantien hatte einen Einfluss auf die monozytäre MHC-II-Expression. Verwendet wurde der PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMP, welcher kompetitiv an PKA bindet und so die cAMP-induzierte Aktivierung der Proteinkinase hemmt. Zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels wurde Forskolin verwendet, ein aus dem Harfenkraut [*Coleus Forskohl*] gewonnener Wirkstoff [Diterpen], der durch Aktivierung der Adenylatcyclase zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Levels und damit zu einer Aktivierung von PKA führt. Auch die Protoporphyrin-vermittelte Hemmung der HLA-DR-Expression in humanen Monozyten war von einer Beeinflussung der PKA-Aktivität unabhängig (Abb. 35). Ähnliches zeigen Versuche mit dem kompetitiven Proteinkinase G (PKG) Inhibitor Rp-8-Br-cGMP oder dem Proteinkinase C (PKC) Inhibitor Gö6850. Weder eine Hemmung der PKG- noch der PKC-Aktivität hatte einen Einfluss auf die konstitutive MHC-II-Expression (Daten nicht gezeigt).

5.3.5 MAPK – Mitogen aktivierte Proteinkinasen

Durch die Aktivierung oder Hemmung der MAPK-vermittelten Signalweiterleitung wird die Expression zahlreicher Moleküle reguliert. Für die Regulation der MHC-II-Expression scheint insbesondere die Aktivierung des Aktivator-Proteins-1 (AP-1) von Bedeutung zu sein. AP-1 wird über Aktivierung der drei MAPK-abhängigen Signaltransduktionswege ERK, p38 und JNK beeinflusst [110]. Eine auf dem pIII-Promotor von CIITA identifizierte AP-1 Bindestelle wird als essentiell für die MAPK-induzierte Hochregulation der HLA-DR-Expression beschrieben [109]. Zudem scheint sowohl die konstitutive als auch die IFN- γ -induzierte CIITA-Expression in BMDC

(aus Knochenmarkszellen gereifte DCs) der Maus durch MAPK reguliert zu sein. Hier zeigte sich, dass die LPS-vermittelte Hemmung der IFN- γ -induzierten CIITA-Expression (LPS-Desensibilisierungsmodell) in den Zellen durch Inhibition von ERK und p38 aufgehoben werden kann [159]. Auch in humanen MDSC wird ein Zusammenhang zwischen MAPK und induzierter MHC-II Expression beobachtet. Eine Hemmung des JNK-Signalweges resultierte in einer Verstärkung der LPS-induzierten HLA-DR-Expression. Allerdings war die LPS-induzierte Expression der MHC-II costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, im Gegensatz zur HLA-DR-Expression, inhibiert [112]. Arrighi et al. postulieren jedoch, dass eine Hemmung des ERK-Signalweges zu einer Hemmung der LPS-induzierten HLA-DR Expression, mit gleichzeitig verminderter Expression von CD80 und CD86, führt [111]. In humanen Monozyten hatte eine Hemmung des p38-Signalweges keine Auswirkung auf die konstitutive HLA-DR-Expression, so dass die hier gezeigten Daten darauf hindeuten, dass die konstitutive Expression von HLA-DR in humanen Monozyten unabhängig von einer p38-Aktivierung ist. Eine Hemmung von JNK resultierte dagegen in einer verminderten, jedoch nicht signifikanten Hemmung der HLA-DR-Expression (Abb. 36). Dies kann auf eine konstitutive Aktivierung des JNK-abhängigen Signalweges hindeuten, durch den es zu einer gesteigerten MHC-II-Expression kommt. Dagegen spricht jedoch, dass weder nach 15min bzw. 30min Inkubation noch zu einem späteren Zeitpunkt (1h, 4h, 8h) eine JNK-Phosphorylierung mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden konnte. Daher sind unspezifische Inhibitoreffekte die wahrscheinliche Ursache der beobachteten Inhibition. Eine genauere Analyse des Signalweges, unter Verwendung eines anderen JNK-Inhibitors, kann hier weitere Informationen liefern.

6. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Protoporphyrin wie CoPP, Hämin und Hämoglobin unabhängig von der gleichzeitig induzierten HO-1-Expression die Expression von HLA-DR, HLA-DM und CD74 in humanen Monozyten hemmen. Dies lässt sich sowohl in einer verminderten Proteinexpression als auch in einer verminderten mRNA-Expression nachweisen, welche durch Hemmung der HO-1 mittels spezifischer siRNA nicht aufgehoben werden konnte. Dieser Effekt ist MHC-II- und Zell-spezifisch, da weder die MHC-I-Expression der Monozyten noch die MHC-II-Expression der B-Zellen beeinflusst wurde. Die verminderte Expression von HLA-DR, HLA-DM und CD74 korreliert mit einer verminderten Expression des MHC-II Masterregulators CIITA. Dieser steuert die Expression der MHC-II Gene, so dass die verminderte CIITA-Expression vermutlich Ursache für die gehemmte Expression von HLA-DR, HLA-DM und CD74 ist. Die hemmenden Effekte sind auch 24h nach Entfernen der Protoporphyrine signifikant gegenüber unbehandelten Kontrollzellen, so dass von einem langanhaltenden Effekt ausgegangen werden kann.

Eine durch Porphyrine vermittelte Hemmung der MHC-II-Expression kann in der Klinik eine wichtige Rolle spielen. Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass durch Porphyrine die antigenpräsentierende Funktion von Monozyten so weit herabgesetzt wird, dass die Zellen nicht mehr adäquat auf Infektionen reagieren können. Die antigenabhängige Aktivierung von T-Zellen wird durch die verminderte MHC-II Expression stark eingeschränkt, was sich in einer verminderten CMV-induzierten Expression von IFN- γ und IL-2 zeigte, während die mitogenabhängige T-Zell-Aktivierung unbeeinflusst blieb [73] .

Eine Porphyrin-Behandlung von Monozyten *in vitro* resultiert in einem ähnlichen Phänotyp, wie er in Monozyten von immundepressiven Patienten beobachtet wird. Porphyrine und porphyrinverwandte Verbindungen kommen im Menschen insbesondere als sauerstoffbindendes Hämoglobin (Häm) und Myoglobin vor. Aber auch Cytochrome (wichtig für die Zellatmung in den Mitochondrien) und verschiedene Enzyme (z.B. Aminolevulinic Acid (ALS-) Synthase, wichtig für Häm-Biosynthese) enthalten Porphyrine. Kommt es zu einer pathologischen Freisetzung von Porphyrinen z.B. durch Verletzungen (schwere Operationen, innere Blutungen, Trauma, Verbrennungen, etc) oder Krankheiten (z.B. Stoffwechselkrankheiten wie Porphyrie) können diese eine Hemmung der antigenabhängigen Immunantwort induzieren, so dass die Patienten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen aufweisen, wie es insbesondere nach schweren Operationen und Trauma beobachtet wird [6,22,29,160] . Ein genaues Verständnis über die durch Porphyrine induzierten intrazellulären Mechanismen kann daher bei der Behandlung der Immundepression neue Therapieansätze liefern.

Die strukturelle Ähnlichkeit der verwendeten Protoporphyrine führte zu der Hypothese, dass CoPP und Hämin über den gleichen Mechanismus wie Hämoglobin wirken. Ein Blockieren der HbHg-Bindedomäne SRCR3 von CD163 konnte jedoch den Hb-Effekt nicht aufheben, so dass die Daten hier eher auf einen CD163-unabhängigen Mechanismus hinweisen. Für eine eindeutige Aussage, wären jedoch weitere Versuche notwendig, wie der Einsatz weiterer CD163-blockierender Antikörper. Die verwendeten Protoporphyrine hemmen sowohl die konstitutive als auch die IFN- γ -induzierte MHC-II Expression. Während über die Regulation der konstitutiven HLA-DR Expression relativ wenig bekannt ist, hängt die IFN- γ -induzierte HLA-DR-Expression von der rezeptorvermittelten STAT-1-Phosphorylierung und der dadurch induzierten CIITA-Expression ab. Die hier präsentierten Daten zeigen, dass die Protoporphyrin-induzierte Hemmung der IFN- γ -abhängigen CIITA-Expression durch eine Hemmung der IFN- γ -induzierten intrazellulären STAT-1-Signalweiterleitung verursacht wird. Da jedoch konstitutiv kein Phospho-STAT-1 zu detektieren war, lässt sich die Hemmung der konstitutiven CIITA- und MHC-II-Expression damit nicht erklären. Zudem ist die konstitutive HLA-DR-Expression in humanen Monozyten unabhängig von STAT-3, da weder eine STAT-3-Phosphorylierung detektiert wurde noch eine Hemmung des JAK/STAT-3 Signalweges die Porphyrin-vermittelten Effekte aufheben konnte. Des Weiteren ist die Porphyrin-vermittelte MHC-II-Suppression unabhängig von einer Induktion der Histondeacetylierung und auch eine Beteiligung von PKA kann auf Grund der Daten ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eindeutig gezeigt, dass Porphyrine die konstitutive und IFN- γ -induzierte MHC-II Expression hemmen und damit die antigenpräsentierende Funktion von humanen Monozyten stark einschränken. Diese MHC-II und Zelltyp-spezifische Hemmung ist unabhängig von HO-1, aber auch von unspezifischen Faktoren wie Zelladhäsion und Serumfaktoren im Medium (Daten nicht gezeigt). Keiner der hier getesteten Signalwege ist eindeutig an der Porphyrin-vermittelten Suppression der konstitutiven MHC-II-Expression beteiligt, so dass für neue Erkenntnisse eine grundlegende Analyse der durch Porphyrine beeinflussten Signalwege und Gene sinnvoll ist. Ein verbessertes Wissen über die durch Porphyrine beeinflussten Signalwege könnte zukünftig neue Ansätze zur frühzeitigen Behandlung bzw. Verhinderung immundepressiver Zustände in intensivpflichtigen Patienten liefern und über die Verhinderung sekundärer Komplikationen die Prognose dieser Patienten verbessern.

Literatur

- [1] Woiciechowsky, C., Schoning, B., Lanksch, W. R., Volk, H. D., Docke, W. D. (1999): Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression, *J Mol Med* (77), 11, p. 769-80
- [2] Volk, H. D.; Reinke, P.; Krausch, D.; Zuckermann, H.; Asadullah, K.; Muller, J. M.; Docke, W. D. und Kox, W. J. (1996): Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis, *Intensive Care Med* (22 Suppl 4), p. S474-81
- [3] Strohmeyer, J. C.; Blume, C.; Meisel, C.; Doecke, W. D.; Hummel, M.; Hoefflich, C.; Thiele, K.; Unbehauen, A.; Hetzer, R. und Volk, H. D. (2003): Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients, *Cytometry B Clin Cytom* (53), 1, p. 54-62
- [4] Le Gall, J. R.; Lemeshow, S. und Saulnier, F. (1993): A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study, *Jama* (270), 24, p. 2957-63
- [5] Grienay, M.; Lukaszewicz, A. C.; Resche-Rigon, M.; Pirracchio, R.; Faivre, V.; Boval, B. und Payen, D. (2009): Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: Interest for prognosis and secondary infection prediction*, *Crit Care Med*
- [6] C. Meisel, C. Höflich, H.D. Volk (2007): Pathophysiologie und Immunmonitoring der Sepsis, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Karger, p. 785–797
- [7] Lendemans, S.; Kreuzfelder, E.; Waydhas, C.; Schade, F. U. und Flohe, S. (2007): Differential immunostimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon gamma (IFNgamma) after severe trauma, *Inflamm Res* (56), 1, p. 38-44
- [8] Docke, W. D.; Randow, F.; Syrbe, U.; Krausch, D.; Asadullah, K.; Reinke, P.; Volk, H. D. und Kox, W. (1997): Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment, *Nat Med* (3), 6, p. 678-81
- [9] Meisel, C.; Schefold, J. C.; Pschowski, R.; Baumann, T.; Hetzger, K.; Gregor, J.; Weber-Carstens, S.; Hasper, D.; Keh, D.; Zuckermann, H.; Reinke, P. und Volk, H. D. (2009): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial, *Am J Respir Crit Care Med* (180), 7, p. 640-8
- [10] Charles Alderson Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik (2005): *Immuno Biology - the immune system in health and disease*; 6th edition
- [11] Ziegler, H. K. (2004): The role of gamma/delta T cells in immunity to infection and regulation of inflammation, *Immunol Res* (29), 1-3, p. 293-302
- [12] Scotet, E.; Nedellec, S.; Devilder, M. C.; Allain, S. und Bonneville, M. (2008): Bridging innate and adaptive immunity through gammadelta T-dendritic cell crosstalk, *Front Biosci* (13), p. 6872-85
- [13] Hirsh, M. I. und Junger, W. G. (2008): Roles of heat shock proteins and gamma delta T cells in inflammation, *Am J Respir Cell Mol Biol* (39), 5, 509-13
- [14] Zhu, J. und Paul, W. E. (2008): CD4 T cells: fates, functions, and faults, *Blood* (112), 5, p. 1557-69
- [15] Romagnani, S. (2008): Human Th17 cells, *Arthritis Res Ther* (10), 2, 206
- [16] Vignali, D. A.; Collison, L. W. und Workman, C. J. (2008): How regulatory T cells work, *Nat Rev Immunol* (8), 7, p. 523-32
- [17] Levings, M. K.; Gregori, S.; Tresoldi, E.; Cazzaniga, S.; Bonini, C. und Roncarolo, M. G. (2005): Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells, *Blood* (105), 3, p. 1162-9
- [18] Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000): Definition of human blood monocytes, *J Leukoc Biol* (67), 5, p. 603-6

- [19] Wanidworanun, C. und Strober, W. (1993): Predominant role of tumor necrosis factor- α in human monocyte IL-10 synthesis, *J Immunol* (151), 12, p. 6853-61
- [20] de Waal Malefyt, R.; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. G. und de Vries, J. E. (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, *J Exp Med* (174), 5, p. 1209-20
- [21] Rock, K. L. und Shen, L. (2005): Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance, *Immunol Rev* (207), 166-83
- [22] Conny Höflich, Hans-Dieter Volk Immunmodulation in der Sepsis
- [23] Schneider, P. und Tschopp, J. (2000): Apoptosis induced by death receptors, *Pharm Acta Helv* (74), 2-3, p. 281-6
- [24] Natoli, G.; Costanzo, A.; Guido, F.; Moretti, F. und Levrero, M. (1998): Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signalling, *Biochem Pharmacol* (56), 8, p. 915-20
- [25] Kox, W. J.; Volk, T.; Kox, S. N. und Volk, H. D. (2000): Immunomodulatory therapies in sepsis, *Intensive Care Med* (26 Suppl 1), p. S124-8
- [26] Tschoeke, S.K., Ertel, W (2007): Immunoparalysis after multiple trauma, *Injury, Int. J.Care injured* (38), p. 1346-1357
- [27] Volk, H. D. (2002): Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection, *Crit Care* (6), 4, p. 279-81
- [28] Menger, M. D. und Vollmar, B. (2004): Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression?, *Langenbecks Arch Surg* (389), 6, p. 475-84
- [29] Asadullah, K.; Woiciechowsky, C.; Docke, W. D.; Egerer, K.; Kox, W. J.; Vogel, S.; Sterry, W. und Volk, H. D. (1995): Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection--immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy, *Eur J Emerg Med* (2), 4, p. 184-90
- [30] Reinke, P. und Volk, H. D. (1992): Diagnostic and predictive value of an immune monitoring program for complications after kidney transplantation, *Urol Int* (49), 2, p. 69-75
- [31] Docke, W. D.; Hoflich, C.; Davis, K. A.; Rottgers, K.; Meisel, C.; Kiefer, P.; Weber, S. U.; Hedwig-Geissing, M.; Kreuzfelder, E.; Tschentscher, P.; Nebe, T.; Engel, A.; Monneret, G.; Spittler, A.; Schmolke, K.; Reinke, P.; Volk, H. D. und Kunz, D. (2005): Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study, *Clin Chem* (51), 12, p. 2341-7
- [32] Abe, R.; Hirasawa, H.; Oda, S.; Sadahiro, T.; Nakamura, M.; Watanabe, E.; Nakada, T. A.; Hatano, M. und Tokuhisa, T. (2008): Up-regulation of interleukin-10 mRNA expression in peripheral leukocytes predicts poor outcome and diminished human leukocyte antigen-DR expression on monocytes in septic patients, *J Surg Res* (147), 1, p. 1-8
- [33] Fumeaux, T. und Pugin, J. (2002): Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock, *Am J Respir Crit Care Med* (166), 11, p. 1475-82
- [34] Asadullah, K.; Sterry, W.; Stephanek, K.; Jasulaitis, D.; Leupold, M.; Audring, H.; Volk, H. D. und Docke, W. D. (1998): IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach, *J Clin Invest* (101), 4, p. 783-94
- [35] Wolk, K.; Docke, W.; von Baehr, V.; Volk, H. und Sabat, R. (1999): Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis, *Pathobiology* (67), 5-6, p. 253-6
- [36] Fogel-Petrovic, M.; Long, J. A.; Misso, N. L.; Foster, P. S.; Bhoola, K. D. und Thompson, P. J. (2007): Physiological concentrations of transforming growth factor β 1 selectively inhibit human dendritic cell function, *Int Immunopharmacol* (7), 14, p. 1924-33
- [37] Ayala, A.; Meldrum, D. R.; Perrin, M. M. und Chaudry, I. H. (1993): The release of transforming growth factor- β following haemorrhage: its role as a mediator of host immunosuppression, *Immunology* (79), 3, p. 479-84
- [38] Demeure, C. E.; Yang, L. P.; Desjardins, C.; Raynauld, P. und Delespesse, G. (1997): Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines, *Eur J Immunol* (27), 12, p. 3526-31

- [39] Strassmann, G.; Patil-Koota, V.; Finkelman, F.; Fong, M. und Kambayashi, T. (1994): Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2, *J Exp Med* (180), 6, p. 2365-70
- [40] Narumiya, S.; Sugimoto, Y. und Ushikubi, F. (1999): Prostanoid receptors: structures, properties, and functions, *Physiol Rev* (79), 4, p. 1193-226
- [41] Koga, K.; Takaesu, G.; Yoshida, R.; Nakaya, M.; Kobayashi, T.; Kinjyo, I. und Yoshimura, A. (2009): Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein, *Immunity* (30), 3, p. 372-83
- [42] Stafford, J. B. und Marnett, L. J. (2008): Prostaglandin E2 inhibits tumor necrosis factor- α RNA through PKA type I, *Biochem Biophys Res Commun* (366), 1, p. 104-9
- [43] Coito, A. J.; Buelow, R.; Shen, X. D.; Amersi, F.; Moore, C.; Volk, H. D.; Busuttil, R. W. und Kupiec-Weglinski, J. W. (2002): Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury, *Transplantation* (74), 1, p. 96-102
- [44] Ke, B.; Shen, X. D.; Buelow, R.; Melinek, J.; Amersi, F.; Gao, F.; Ritter, T.; Volk, H. D.; Busuttil, R. W. und Kupiec-Weglinski, J. W. (2002): Heme oxygenase-1 gene transfer prevents CD95/FasL-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway, *Transplant Proc* (34), 5, p. 1465-6
- [45] Amersi, F.; Shen, X. D.; Anselmo, D.; Melinek, J.; Iyer, S.; Southard, D. J.; Katori, M.; Volk, H. D.; Busuttil, R. W.; Buelow, R. und Kupiec-Weglinski, J. W. (2002): Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway, *Hepatology* (35), 4, p. 815-23
- [46] Poss, K. D. und Tonegawa, S. (1997): Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization, *Proc Natl Acad Sci U S A* (94), 20, p. 10919-24
- [47] Poss, K. D. und Tonegawa, S. (1997): Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (94), 20, p. 10925-30
- [48] Listopad, J.; Asadullah, K.; Sievers, C.; Ritter, T.; Meisel, C.; Sabat, R. und Docke, W. D. (2007): Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells, *Exp Dermatol* (16), 8, p. 661-70
- [49] Kawashima, A.; Oda, Y.; Yachie, A.; Koizumi, S. und Nakanishi, I. (2002): Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case, *Hum Pathol* (33), 1, p. 125-30
- [50] Yachie, A.; Niida, Y.; Wada, T.; Igarashi, N.; Kaneda, H.; Toma, T.; Ohta, K.; Kasahara, Y. und Koizumi, S. (1999): Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency, *J Clin Invest* (103), 1, p. 129-35
- [51] Tenhunen, R.; Marver, H. S. und Schmid, R. (1968): The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase, *Proc Natl Acad Sci U S A* (61), 2, 748-55
- [52] Schacter, B. A. (1988): Heme catabolism by heme oxygenase: physiology, regulation, and mechanism of action, *Semin Hematol* (25), 4, p. 349-69
- [53] McCoubrey, W. K., Jr.; Huang, T. J. und Maines, M. D. (1997): Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3, *Eur J Biochem* (247), 2, p. 725-32
- [54] McCoubrey, W. K., Jr.; Ewing, J. F. und Maines, M. D. (1992): Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal, *Arch Biochem Biophys* (295), 1, p. 13-20
- [55] Choi, A. M. und Alam, J. (1996): Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury, *Am J Respir Cell Mol Biol* (15), 1, p. 9-19
- [56] Halliwell, B. (1978): Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems?, *FEBS Lett* (92), 2, p. 321-6

- [57] Vile, G. F. und Tyrrell, R. M. (1993): Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin, *J Biol Chem* (268), 20, p. 14678-81
- [58] Nakagami, T.; Toyomura, K.; Kinoshita, T. und Morisawa, S. (1993): A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin, *Biochim Biophys Acta* (1158), 2, p. 189-93
- [59] Haga, Y.; Tempero, M. A.; Kay, D. und Zetterman, R. K. (1996): Intracellular accumulation of unconjugated bilirubin inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation and interleukin-2 production of human lymphocytes, *Dig Dis Sci* (41), 7, p. 1468-74
- [60] Haga, Y.; Tempero, M. A. und Zetterman, R. K. (1996): Unconjugated bilirubin inhibits in vitro major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of human lymphocytes, *Biochim Biophys Acta* (1316), 1, p. 29-34
- [61] Dore, S.; Takahashi, M.; Ferris, C. D.; Zakhary, R.; Hester, L. D.; Guastella, D. und Snyder, S. H. (1999): Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury, *Proc Natl Acad Sci U S A* (96), 5, p. 2445-50
- [62] Otterbein, L. E.; Bach, F. H.; Alam, J.; Soares, M.; Tao Lu, H.; Wysk, M.; Davis, R. J.; Flavell, R. A. und Choi, A. M. (2000): Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway, *Nat Med* (6), 4, p. 422-8
- [63] Song, R.; Mahidhara, R. S.; Zhou, Z.; Hoffman, R. A.; Seol, D. W.; Flavell, R. A.; Billiar, T. R.; Otterbein, L. E. und Choi, A. M. (2004): Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway, *J Immunol* (172), 2, p. 1220-6
- [64] Sammut, I. A.; Foresti, R.; Clark, J. E.; Exon, D. J.; Vesely, M. J.; Sarathchandra, P.; Green, C. J. und Motterlini, R. (1998): Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1, *Br J Pharmacol* (125), 7, p. 1437-44
- [65] Decker, K. und Keppler, D. (1974): Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 71, p. 77-106
- [66] Lehmann, V.; Freudenberg, M. A. und Galanos, C. (1987): Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice, *J Exp Med* (165), 3, p. 657-63
- [67] Sass, G.; Seyfried, S.; Parreira Soares, M.; Yamashita, K.; Kaczmarek, E.; Neuhuber, W. L. und Tiegs, G. (2004): Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury, *Hepatology* (40), 5, p. 1128-35
- [68] Abraham, N. G.; Lavrovsky, Y.; Schwartzman, M. L.; Stoltz, R. A.; Levere, R. D.; Gerritsen, M. E.; Shibahara, S. und Kappas, A. (1995): Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (92), 15, p. 6798-802
- [69] Martins, P. N.; Kessler, H.; Jurisch, A.; Reutzel-Selke, A.; Kramer, J.; Pascher, A.; Pratschke, J.; Neuhaus, P.; Volk, H. D. und Tullius, S. G. (2005): Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity, *Transplant Proc* (37), 1, p. 384-6
- [70] Panahian, N.; Yoshiura, M. und Maines, M. D. (1999): Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice, *J Neurochem* (72), 3, p. 1187-203
- [71] Chora, A. A.; Fontoura, P.; Cunha, A.; Pais, T. F.; Cardoso, S.; Ho, P. P.; Lee, L. Y.; Sobel, R. A.; Steinman, L. und Soares, M. P. (2007): Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation, *J Clin Invest* (117), 2, p. 438-47
- [72] Wu, J.; Ma, J.; Fan, S. T.; Schlitt, H. J. und Tsui, T. Y. (2005): Bilirubin derived from heme degradation suppresses MHC class II expression in endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* (338), 2, p. 890-6
- [73] Sievers, Claudia (2005): Beeinflussung der Funktion von T-Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen durch die Hämooxygenase-1 (Diplomarbeit)
- [74] Mitani, K.; Fujita, H.; Kappas, A. und Sassa, S. (1992): Heme oxygenase is a positive acute-phase reactant in human Hep3B hepatoma cells, *Blood* (79), 5, p. 1255-9

- [75] Wagener, F. A.; Volk, H. D.; Willis, D.; Abraham, N. G.; Soares, M. P.; Adema, G. J. und Figdor, C. G. (2003): Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation, *Pharmacol Rev* (55), 3, p. 551-71
- [76] Kappas, A. und Drummond, G. S. (1986): Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins, *J Clin Invest* (77), 2, p. 335-9
- [77] Maines, M. D. (1981): Zinc . protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat, *Biochim Biophys Acta* (673), 3, p. 339-50
- [78] Shan, Y.; Pepe, J.; Lu, T. H.; Elbirt, K. K.; Lambrecht, R. W. und Bonkovsky, H. L. (2000): Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins, *Arch Biochem Biophys* (380), 2, p. 219-27
- [79] Schaer, D. J.; Alayash, A. I. und Buehler, P. W. (2007): Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor, *Antioxid Redox Signal* (9), 7, p. 991-9
- [80] Kristiansen, M.; Graversen, J. H.; Jacobsen, C.; Sonne, O.; Hoffman, H. J.; Law, S. K. und Moestrup, S. K. (2001): Identification of the haemoglobin scavenger receptor, *Nature* (409), 6817, p. 198-201
- [81] Fabrick, B. O.; Dijkstra, C. D. und van den Berg, T. K. (2005): The macrophage scavenger receptor CD163, *Immunobiology* (210), 2-4, p. 153-60
- [82] Schaer, D. J.; Schaer, C. A.; Schoedon, G.; Imhof, A. und Kurrer, M. O. (2006): Hemophagocytic macrophages constitute a major compartment of heme oxygenase expression in sepsis, *Eur J Haematol* (77), 5, p. 432-6
- [83] Dennis, C. (2001): Haemoglobin scavenger; Molecular physiology, *Nature* (Vol 409)
- [84] Backé, E., Schwarting, R., Gerdes, J., Ernst, M., Stein, H. (1991): Ber-MAC3: new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen, *J. Clin. Pathol.*, 44, p. 936-945
- [85] Sulahian, T. H.; Hogger, P.; Wahner, A. E.; Wardwell, K.; Goulding, N. J.; Sorg, C.; Droste, A.; Stehling, M.; Wallace, P. K.; Morganelli, P. M. und Guyre, P. M. (2000): Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155, *Cytokine* (12), 9, p. 1312-21
- [86] Buechler, C.; Ritter, M.; Orso, E.; Langmann, T.; Klucken, J. und Schmitz, G. (2000): Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli, *J Leukoc Biol* (67), 1, p. 97-103
- [87] Philippidis, P.; Mason, J. C.; Evans, B. J.; Nadra, I.; Taylor, K. M.; Haskard, D. O. und Landis, R. C. (2004): Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery, *Circ Res* (94), 1, p. 119-26
- [88] Ting, J. P. und Trowsdale, J. (2002): Genetic control of MHC class II expression, *Cell* (109 Suppl), p. S21-33
- [89] LeibundGut-Landmann, S.; Waldburger, J. M.; Krawczyk, M.; Otten, L. A.; Suter, T.; Fontana, A.; Acha-Orbea, H. und Reith, W. (2004): Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes, *Eur J Immunol* (34), 6, p. 1513-25
- [90] Wright, K. L. und Ting, J. P. (2006): Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes, *Trends Immunol* (27), 9, p. 405-12
- [91] Muhlethaler-Mottet, A.; Otten, L. A.; Steimle, V. und Mach, B. (1997): Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA, *Embo J* (16), 10, p. 2851-60
- [92] Schroder, M.; Meisel, C.; Buhl, K.; Profanter, N.; Sievert, N.; Volk, H. D. und Grutz, G. (2003): Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization, *J Immunol* (170), 10, p. 5260-7

- [93] Volk, H.; Asadullah, K.; Gallagher, G.; Sabat, R. und Grutz, G. (2001): IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets, *Trends Immunol* (22), 8, p. 414-7
- [94] Grutz, G. (2005): New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression, *J Leukoc Biol* (77), 1, p. 3-15
- [95] Koppelman, B.; Neefjes, J. J.; de Vries, J. E. und de Waal Malefyt, R. (1997): Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling, *Immunity* (7), 6, p. 861-71
- [96] de Waal Malefyt, R.; Haanen, J.; Spits, H.; Roncarolo, M. G.; te Velde, A.; Figdor, C.; Johnson, K.; Kastelein, R.; Yssel, H. und de Vries, J. E. (1991): Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression, *J Exp Med* (174), 4, p. 915-24
- [97] Plattner, H., Hentschel, J. (1997): Taschenlehrbuch Zellbiologie
- [98] Sadoul, K.; Boyault, C.; Pabion, M. und Khochbin, S. (2008): Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases, *Biochimie* (90), 2, p. 306-12
- [99] Zika, E. und Ting, J. P. (2005): Epigenetic control of MHC-II: interplay between CIITA and histone-modifying enzymes, *Curr Opin Immunol* (17), 1, p. 58-64
- [100] Zika, E.; Greer, S. F.; Zhu, X. S. und Ting, J. P. (2003): Histone deacetylase 1/mSin3A disrupts gamma interferon-induced CIITA function and major histocompatibility complex class II enhanceosome formation, *Mol Cell Biol* (23), 9, p. 3091-102
- [101] Kong, X.; Fang, M.; Li, P.; Fang, F. und Xu, Y. (2009): HDAC2 deacetylates class II transactivator and suppresses its activity in macrophages and smooth muscle cells, *J Mol Cell Cardiol* (46), 3, p. 292-9
- [102] Ivashkiv, L. B., Ayres, A. and Glimcher, L. H. (1994): Inhibition of IFN-gamma induction of class II MHC genes by cAMP and prostaglandins., *Immunopharmacology* (27:67)
- [103] Li, G.; Harton, J. A.; Zhu, X. und Ting, J. P. (2001): Downregulation of CIITA function by protein kinase a (PKA)-mediated phosphorylation: mechanism of prostaglandin E, cyclic AMP, and PKA inhibition of class II major histocompatibility complex expression in monocytic lines, *Mol Cell Biol* (21), 14, p. 4626-35
- [104] Sisk, T. J.; Nickerson, K.; Kwok, R. P. und Chang, C. H. (2003): Phosphorylation of class II transactivator regulates its interaction ability and transactivation function, *Int Immunol* (15), 10, p. 1195-205
- [105] Xia, Z.; Dickens, M.; Raingeaud, J.; Davis, R. J. und Greenberg, M. E. (1995): Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science* (270), 5240, p. 1326-31
- [106] Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B. E.; Karandikar, M.; Berman, K. und Cobb, M. H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr Rev* (22), 2, p. 153-83
- [107] Karin, M. (1998): Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses, *Ann N Y Acad Sci* (851), 139-46
- [108] Ichijo, H. (1999): From receptors to stress-activated MAP kinases, *Oncogene* (18), 45, p. 6087-93
- [109] Martins, I.; Deshayes, F.; Baton, F.; Forget, A.; Ciechomska, I.; Sylla, K.; Aoudjit, F.; Charron, D.; Al-Daccak, R. und Alcaide-Loridan, C. (2007): Pathologic expression of MHC class II is driven by mitogen-activated protein kinases, *Eur J Immunol* (37), 3, p. 788-97
- [110] Whitmarsh, A. J. und Davis, R. J. (1996): Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways, *J Mol Med* (74), 10, p. 589-607
- [111] Arrighi, J. F.; Rebsamen, M.; Rousset, F.; Kindler, V. und Hauser, C. (2001): A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers, *J Immunol* (166), 6, p. 3837-45
- [112] Nakahara, T.; Uchi, H.; Urabe, K.; Chen, Q.; Furue, M. und Moroi, Y. (2004): Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells, *Int Immunol* (16), 12, p. 1701-9

- [113] Chapman, H. A. (1998): Endosomal proteolysis and MHC class II function, *Curr Opin Immunol* (10), 1, p. 93-102
- [114] Neefjes, J. (1999): CIIV, MIIIC and other compartments for MHC class II loading, *Eur J Immunol* (29), 5, p. 1421-5
- [115] Landsverk, O. J.; Bakke, O. und Gregers, T. F. (2009): MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain, *Scand J Immunol* (70), 3, p. 184-93
- [116] Schroder, K., Herzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *Journal of Leukocyte Biology* (75), p. 163-189
- [117] Reith, W., Leibundgut-Landmann, S., Waldburger, J.-M. (2005): Regulation Of MHC Class II Gene Expression By The Class II Transactivator, *Nature reviews, immunology* (5), p. 793-806
- [118] Blaskovich, M. A.; Sun, J.; Cantor, A.; Turkson, J.; Jove, R. und Sebt, S. M. (2003): Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice, *Cancer Res* (63), 6, p. 1270-9
- [119] Sukharev, S. I.; Klenchin, V. A.; Serov, S. M.; Chernomordik, L. V. und Chizmadzhev Yu, A. (1992): Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores, *Biophys J* (63), 5, p. 1320-7
- [120] Mülhardt, C. (2004): Chaotrope Salze - Das gezähmte Durcheinander, *Laborjournal* - online
- [121] Hall, T. M. (2002): Poly(A) tail synthesis and regulation: recent structural insights, *Curr Opin Struct Biol* (12), 1, p. 82-8
- [122] Backé, E., Schwarting, R., Gerdes, J., Ernst, M., Stein, H. (1991): Ber-MAC3: new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen, *J. Clin. Pathol.* (44), p. 936-945
- [123] Lee, T. S. und Chau, L. Y. (2002): Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice, *Nat Med* (8), 3, p. 240-6
- [124] Madsen, M.; Moller, H. J.; Nielsen, M. J.; Jacobsen, C.; Graversen, J. H.; van den Berg, T. und Moestrup, S. K. (2004): Molecular characterization of the haptoglobin.hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region, *J Biol Chem* (279), 49, p. 51561-7
- [125] Mashreghi, M. F.; Klemz, R.; Knosalla, I. S.; Gerstmayer, B.; Janssen, U.; Buelow, R.; Jozkowicz, A.; Dulak, J.; Volk, H. D. und Kotsch, K. (2008): Inhibition of dendritic cell maturation and function is independent of heme oxygenase 1 but requires the activation of STAT3, *J Immunol* (180), 12, p. 7919-30
- [126] Williams, L.; Bradley, L.; Smith, A. und Foxwell, B. (2004): Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages, *J Immunol* (172), 1, p. 567-76
- [127] Riley, J. K.; Takeda, K.; Akira, S. und Schreiber, R. D. (1999): Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action, *J Biol Chem* (274), 23, p. 16513-21
- [128] Akira, S. (1997): IL-6-regulated transcription factors, *Int J Biochem Cell Biol* (29), 12, p. 1401-18
- [129] Magner, W. J.; Kazim, A. L.; Stewart, C.; Romano, M. A.; Catalano, G.; Grande, C.; Keiser, N.; Santaniello, F. und Tomasi, T. B. (2000): Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors, *J Immunol* (165), 12, p. 7017-24
- [130] Scheithauer, M. und Riechelmann, H. (2003): [Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing], *Laryngorhinootologie* (82), 1, 31-5
- [131] Meisel, C.; Schwab, J. M.; Prass, K.; Meisel, A. und Dirnagl, U. (2005): Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome, *Nat Rev Neurosci* (6), 10, p. 775-86
- [132] Dirnagl, U.; Klehmet, J.; Braun, J. S.; Harms, H.; Meisel, C.; Ziemssen, T.; Prass, K. und Meisel, A. (2007): Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance, *Stroke* (38), 2 Suppl, p. 770-3

- [133] Chauveau, C.; Remy, S.; Royer, P. J.; Hill, M.; Tanguy-Royer, S.; Hubert, F. X.; Tesson, L.; Brion, R.; Beriou, G.; Gregoire, M.; Josien, R.; Cuturi, M. C. und Anegon, I. (2005): Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression, *Blood* (106), 5, p. 1694-702
- [134] Anderson, K. E. und Collins, S. (2006): Open-label study of hemin for acute porphyria: clinical practice implications, *Am J Med* (119), 9, p. 801 e19-24
- [135] Pachot, A.; Monneret, G.; Brion, A.; Venet, F.; Bohe, J.; Bienvenu, J.; Mougin, B. und Lepape, A. (2005): Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients, *Crit Care Med* (33), 1, p. 31-8; discussion 236-7
- [136] Carrasco-Marin, E.; Alvarez-Dominguez, C.; Lopez-Mato, P.; Martinez-Palencia, R. und Leyva-Cobian, F. (1996): Iron salts and iron-containing porphyrins block presentation of protein antigens by macrophages to MHC class II-restricted T cells, *Cell Immunol* (171), 2, p. 173-85
- [137] Smith, A.; Alam, J.; Escriba, P. V. und Morgan, W. T. (1993): Regulation of heme oxygenase and metallothionein gene expression by the heme analogs, cobalt-, and tin-protoporphyrin, *J Biol Chem* (268), 10, p. 7365-71
- [138] Schaer, C. A.; Schoedon, G.; Imhof, A.; Kurrer, M. O. und Schaer, D. J. (2006): Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin, *Circ Res* (99), 9, p. 943-50
- [139] Ritter, M.; Buechler, C.; Kapinsky, M. und Schmitz, G. (2001): Interaction of CD163 with the regulatory subunit of casein kinase II (CKII) and dependence of CD163 signaling on CKII and protein kinase C, *Eur J Immunol* (31), 4, p. 999-1009
- [140] Mengozzi, M., and P. Ghezzi (1993): Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance, *Eur. Cytokine Network* 4, p. 89
- [141] Sanchez-Cantu, L., H. N. Rode, and N. V. christou (1989): Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor, *Arch. Surg.* (124), 1432
- [142] Van den Heuvel, M. M.; Tensen, C. P.; van As, J. H.; Van den Berg, T. K.; Fluitsma, D. M.; Dijkstra, C. D.; Dopp, E. A.; Droste, A.; Van Gaalen, F. A.; Sorg, C.; Hogger, P. und Beelen, R. H. (1999): Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation, *J Leukoc Biol* (66), 5, p. 858-66
- [143] van den Elsen, P. J.; Holling, T. M.; Kuipers, H. F. und van der Stoep, N. (2004): Transcriptional regulation of antigen presentation, *Curr Opin Immunol* (16), 1, p. 67-75
- [144] Pai, R. K.; Askew, D.; Boom, W. H. und Harding, C. V. (2002): Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator, *J Immunol* (169), 3, p. 1326-33
- [145] Mense, S. M. und Zhang, L. (2006): Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases, *Cell Res* (16), 8, p. 681-92
- [146] Sassa, S. und Nagai, T. (1996): The role of heme in gene expression, *Int J Hematol* (63), 3, p. 167-78
- [147] Padmanaban, G.; Venkateswar, V. und Rangarajan, P. N. (1989): Haem as a multifunctional regulator, *Trends Biochem Sci* (14), 12, p. 492-6
- [148] Wagener, F. A.; Eggert, A.; Boerman, O. C.; Oyen, W. J.; Verhofstad, A.; Abraham, N. G.; Adema, G.; van Kooyk, Y.; de Witte, T. und Figdor, C. G. (2001): Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase, *Blood* (98), 6, p. 1802-11
- [149] Arruda, M. A.; Graca-Souza, A. V. und Barja-Fidalgo, C. (2005): Heme and innate immunity: new insights for an old molecule, *Mem Inst Oswaldo Cruz* (100), 7, p. 799-803
- [150] Graca-Souza, A. V.; Arruda, M. A.; de Freitas, M. S.; Barja-Fidalgo, C. und Oliveira, P. L. (2002): Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes, *Blood* (99), 11, p. 4160-5
- [151] Decker, T. und Kovarik, P. (2000): Serine phosphorylation of STATs, *Oncogene* (19), 21, p. 2628-37

- [152] Murray, P. J. (2007): The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration, *J Immunol* (178), 5, p. 2623-9
- [153] Jenuwein, T. und Allis, C. D. (2001): Translating the histone code, *Science* (293), 5532, p. 1074-80
- [154] Beresford, G. W. und Boss, J. M. (2001): CIITA coordinates multiple histone acetylation modifications at the HLA-DRA promoter, *Nat Immunol* (2), 7, p. 652-7
- [155] Kambayashi, T.; Wallin, R. P. und Ljunggren, H. G. (2001): cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function, *J Leukoc Biol* (70), 6, p. 903-10
- [156] Ivashkiv, L. B. und Glimcher, L. H. (1991): Repression of class II major histocompatibility complex genes by cyclic AMP is mediated by conserved promoter elements, *J Exp Med* (174), 6, p. 1583-92
- [157] Chakrabarti, R. and Erickson, K. L (1996): Tyrosine kinase but not phospholipid/Ca²⁺ signaling pathway is involved in interferon-gamma stimulation of Ia expression in macrophages, *J. Cell. Biochem* (60), 235
- [158] Basta, P. V., Moore, T. L., Yokota, S. and Ting, J. P.-Y. (1989): A β -adrenergic agonist modulates DR gene transcription via enhanced cAMP levels in a glioblastoma multiforme line., *J. Immunol* (142:2895)
- [159] Yao, Y.; Xu, Q.; Kwon, M. J.; Matta, R.; Liu, Y.; Hong, S. C. und Chang, C. H. (2006): ERK and p38 MAPK signaling pathways negatively regulate CIITA gene expression in dendritic cells and macrophages, *J Immunol* (177), 1, p. 70-6
- [160] Angele, M. K. und Faist, E. (2002): Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection, *Crit Care* (6), 4, p. 298-305

Anhang

Veröffentlichungen

Publikation

Listopad J, Asadullah K, Sievers C, Ritter T, Meisel C, Sabat R, Döcke WD.

Heme oxygenase-1 inhibits T cell- dependent skin inflammation and differentiation and function of antigenpresenting cells, Exp Dermatol (Impact factor: 2,183). 2007 Aug;16(8):661-70

Abstracts

Claudia Sievers, Christian Meisel, Hans-Dieter Volk

Induction of heme oxygenase-1 impairs antigen-spezific T cell responses by inhibition of dendritic cell and monocyte function, 16th European Congress of Immunology (ECI), 2006 Sep. (Poster)

Claudia Sievers, Kasia Nasilowska, Kerstin Wolk, Robert Sabat, Hans-Dieter Volk, Christian Meisel

HO-1 inhibits constitutive and IFN γ -induced HLA-DR expression on myeloid antigen-presenting cells via inhibition of IFN γ receptor signalling and down-regulation of CIITA expression, 37. Annual Meeting of the German Society for Immunology, 2007 Sep.

(Poster und Vortrag)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsamt vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit schulde ich vielen Menschen einen großen Dank.

An erster Stelle möchte ich mich deshalb bei Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Volk bedanken, der es mir ermöglicht hat, am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin diese Doktorarbeit anzufertigen. Sein stetiges Interesse am Fortgang der Forschungsarbeit und die vielfältige Unterstützung hat sehr zu ihrem Gelingen beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Herrn Dr. Christian Meisel. Durch seine Bereitschaft die Ergebnisse zu diskutieren, sowie seine wertvollen Anregungen und Ratschläge hat er mich so weit unterstützt wie es notwendig war, mir aber auch die Freiheit gelassen selbstständig zu planen und handeln.

Bei Herrn Prof. Dr. Alf Hamann und Frau Prof. Dr. Corinna Hermann bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Dissertation. An gleicher Stelle danke ich meinem 1. Vorsitzenden der Prüfungskommission Herrn Prof. Dr. Andreas Herrmann

Zudem bedanke ich mich bei allen Freunden und Kollegen die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke für die fachliche und private Unterstützung, so dass meine Jahre in Berlin zu einer unvergesslichen Zeit wurden.

Und natürlich bedanke ich mich bei all den Blutspender, die mir ihre Monozyten anvertraut haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

I have not failed. I've just found 10,000 ways that won't work.

Thomas Alva Edison

(1847 – 1931)